

24139.4

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**INTERAÇÃO DOPAMINA-ACETILCOLINA - AÇÃO DE
DROGAS QUE ATUAM NOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO
E COLINÉRGICO EM CÓRTEX MOTOR E CORPO
ESTRIADO DE RATO**

FRANCISCA CLÉA FLORENÇO DE SOUSA

FC-00003312-5

TAB
DE I
26/02
1998

Fortaleza-CE

24139.4
R. 1000 18/198
MU 05/05/98

1997

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R. 800295 / 98	
05 / 05 / 98	

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E FARMACOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**INTERAÇÃO DOPAMINA-ACETILCOLINA - AÇÃO DE
DROGAS QUE ATUAM NOS SISTEMAS DOPAMINÉRGICO
E COLINÉRGICO EM CÓRTEX MOTOR E CORPO
ESTRIADO DE RATO**

FRANCISCA CLÉA FLORENÇO DE SOUSA

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação
em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará - UFC,
para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce S. B. Viana.

Fortaleza-CE

1997

Esta Tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Francisca Cléa Florenço de Sousa

Dissertação aprovada em: 13/03/97

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Glauce S. B. Viana
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
UFC
Orientadora da Tese

Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal de São Paulo
UNIFESP

Prof. Dr. Frederico Guilherme Graeff
Setor de Psicobiologia
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
USP

Profa. Dra. Veralice M. S. de Bruin
Departamento de Medicina Clínica
UFC

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
UFC

A Deus, meu maior bem

À minha família
(Pedro, Maria José, Cleide e Clésio)

“Os livros sempre continuarão a ser escritos; estudar demais cansa a mente. De tudo o que foi dito, a conclusão é esta: Tema a Deus e obedeça aos seus mandamentos porque foi para isso que fomos criados.”

(Eclesiastes 12:11-14)

“A criatividade científica, em si, não pode ser tomada como método científico; é ela livre de operar, até o momento em que deve entrar em cena a verificação ou veracidade dos devaneios do cientista que emitiu uma nova teoria...”

(Rocha e Silva, 1976)

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Glauce S. B. Viana*, por quem tenho grande admiração pelo seu caráter ilibado, trabalho árduo e dedicação à Universidade. Sua vida universitária é para mim um exemplo. Sua orientação não tem preço. Muito obrigada pela sua disponibilidade em ajudar todas as vezes que precisei, e pelo apoio sempre presente.

Aos Profs. Drs. *Antônio José Lapa e Frederico Guilherme Graeff* por terem gentilmente aceito participar da minha Banca de Doutorado.

Ao Prof. Dr. *Krishnamurti de Moraes Carvalho*, pela disposição em ajudar e pelo apoio como Coordenador do Curso de Pós-Graduação, bem como pela gentileza de participar da minha Banca de Tese.

À Profa. Dra. *Veralice M. S. de Bruin* pela colaboração, simpatia e disponibilidade em ajudar, e por ter gentilmente aceito o convite para participar da minha banca examinadora.

Ao Dr. *Francisco Sá Cavalcante*, Delegado da Polícia Federal, que gentilmente e sem medir esforços nos forneceu a cocaína para o desenvolvimento de parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. *Odorico de Moraes*, meu amigo de todas as horas durante o desenvolvimento deste trabalho. Pelos conhecimentos em computação que me permitiram digitar esta tese, pelo apoio constante e ensinamentos preciosos.

À Profa. Dra. *Elisabete Moraes* pela amizade, estímulo, apoio sempre presente e pelo tempo dedicado às correções finais. Obrigada de coração!

Aos meus colegas professores do Depto de Fisiologia e Farmacologia, em especial (*Gisela C. Camarão, Helena Serra Azul, Vietla S. Rao, Carlos Alberto Flores, Eduardo Torres, Marcos R. Vale e Alberto Soares*) compreensivos e colaboradores em todos os momentos durante o desenvolvimento desta tese.

As minhas queridas e inestimáveis “bolsistas” que tanto me ajudaram (sem elas tudo seria muito mais difícil): *Danielle Silveira Macêdo, Emmanuelle Coelho Noronha, Geysa Viana Aguiar e Patrícia Bezerra Gomes*, o meu mais sincero: obrigada!

A minha sempre amiga, *Profa. Marta Maria Fonteles Marinho*, constantemente me ajudando no laboratório, me “suportando” nos momentos ruins, dando força, incentivo e principalmente estando do meu lado incondicionalmente.

Ao *Tiago Gurgel do Vale*, pelo carinho, compreensão e companheirismo dedicados, pela disposição em ajudar. Valeu a pena!

As minhas preciosas amigas: *Magda Ferreira, Rosa Tavares e Socorro Rodrigues* (pelo apoio constante nas orações que me levantaram inúmeras vezes e que me deram força para continuar); meras palavras não conseguirão expressar todo o meu agradecimento.

À “turma” do Laboratório de Neurofarmacologia pelo convívio sempre agradável. Em especial, o meu muito obrigada às técnicas, *Vilani Rodrigues Bastos e Ana Eclésia Moura Rodrigues*, que me ajudaram em

vários momentos; à *Silvânia Maria Mendes Vasconcelos* sempre amiga e tão prestativa que me ajudou na elaboração dos *slides*, e ao seu esposo *Cláudio Patrocínio* também sempre disponível para ajudar.

Meu sincero agradecimento à *Coordenação do Curso de Pós-Graduação (Drs.: Manassés Claudino Fonteles, Krishnamurti de Moraes Carvalho, Aldo Ângelo Moreira Lima, Marcos Raimundo Vale)* e aos meus *colegas de Pós-Graduação* que creditaram em mim confiança como Representante Estudantil. Ao secretário de Pós-Graduação, *Vasco Pinheiro Diógenes Bastos* pelo apoio constante.

Ao *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* e à *Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP)*, pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.



SUMÁRIO

ABREVIATURAS	xxii
ABSTRACT	xxvi
RESUMO	xxiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
1 - Sistema dopaminérgico	1
1.1 - Regulação dopaminérgica	1
1.2 - Vias dopaminérgicas no SNC	2
1.3 - Receptores dopaminérgicos	3
1.3.1 - Classificação	3
1.3.2 - Localização	6
1.3.3 - Perspectivas	10
2 - Sistema colinérgico muscarínico	13
2.1 - Vias colinérgicas no SNC	13
2.2 - Receptores muscarínicos	15
2.2.1 - Localização dos subtipos de receptores muscarínicos	16
2.2.2 - Mecanismos de transdução do sinal	17
2.2.3 - Perspectivas	20
3 - Interação dopamina-acetilcolina	24
3.1 - Drogas que atuam nos sistemas dopaminérgico ou colinérgico	27
OBJETIVOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
1 - Animais	33
2 - Preparo das drogas	33
2.1 - Mazindol, pimozida e sulpirida	33
2.2 - Carbacol, atropina e apomorfina	34
3 - Tratamento dos grupos experimentais	34
4 - Material utilizado nos experimentos	37

5 - Dissecção das áreas cerebrais	38
6 - Determinação da densidade de receptores muscarínicos	39
6.1 - Método	40
6.2 - Procedimento experimental	40
6.3 - Soluções reagentes	41
7 - Determinação da densidade dos receptores dopaminérgicos	42
7.1 - Método	43
7.2 - Procedimento experimental	44
7.3 - Soluções reagentes	45
8 - Determinação dos níveis de nucleotídeos cíclicos	46
8.1 - Preparação dos homogenatos	46
8.2 - AMPc	46
8.2.1 - Método	46
8.2.2 - Reagentes do kit comercial	48
8.3 - GMPc	48
8.3.1 - Método	48
8.3.2 - Reagentes do kit comercial	50
8.4 - Medida da radioatividade	50
9 - Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)	51
9.1 - Método	51
9.2 - Soluções reagentes	52
10.0 - Dosagem de proteína	53
10.1 - Método	53
10.2 - Soluções reagentes	54
11.0 - Testes comportamentais	54
11.1 - Teste de catalepsia	54
11.2 - Teste de campo aberto	55
12.0 - Análise estatística	55
PROTOCOLO I - Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos ou dopaminérgicos sobre o comportamento	

(campo aberto e catalepsia) de rato	56
Introdução	57
Objetivos	59
Resultados	60
Discussão	67
Conclusões	74
PROTOCOLO II - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos em córtex motor de rato	75
Introdução	76
Objetivos	78
Resultados	79
Discussão	87
Conclusões	92
PROTOCOLO III - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato	93
Introdução	94
Objetivos	95
Resultados	96
Discussão	108
Conclusões	113
PROTOCOLO IV - Efeito de agonista e antagonista muscarínico e sua associação com agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato	114
Introdução	115
Objetivos	117
Resultados	118

Discussão	128
Conclusões	132
ROTOCOLO V - Efeito da cocaína sobre os receptores uscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato	
	133
Introdução	134
Objetivos	136
Resultados	137
Discussão	145
Conclusões	148
ROTOCOLO VI - Efeito de agonista e antagonista uscarínico ou dopaminérgico sobre os níveis de nucleotídeos clicos (AMPc e GMPc) em córtex motor e corpo estriado de rato	
	149
Introdução	150
Objetivos	153
Resultados	154
Discussão	160
Conclusões	165
ROTOCOLO VII - Efeito de agonistas e antagonistas uscarínicos ou dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor e corpo estriado de rato	
	166
Introdução	167
Objetivos	169
Resultados	170
Discussão	178
Conclusões	182
CONSIDERAÇÕES FINAIS	183
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	185

LISTA DE TABELAS

PROTOCOLO II

Tabela 1 -	Efeito da pimozida, mazindol e apomorfina sozinhos ou em combinação sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS (M1+M2-símile) em córtex motor cerebral de rato	82
Tabela 2 -	Efeito da pimozida, mazindol e apomorfina sozinhos ou em combinação sobre a densidade de receptores M1 e M2-símile em córtex motor cerebral de rato	83
Tabela 3 -	Efeito do mazindol sobre os receptores muscarínicos (Bmax e Kd) em córtex motor de rato	84

PROTOCOLO III

Tabela 1 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS (M1+M2-símile) em corpo estriado de rato	101
Tabela 2 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS (M1-símile) em corpo estriado de rato	102
Tabela 3 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS (M2-símile) em corpo estriado de rato	103
Tabela 4 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o <i>binding</i> de 3H-SCH	

	23390 (D1-símile) em corpo estriado de rato	104
Tabela 5 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o <i>binding</i> de 3H-espiroperidol (D2-símile) em corpo estriado de rato	105
Tabela 6 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos presentes no <i>binding</i> de 3H-NMS (M1+M2-símile) em corpo estriado de rato	106
Tabela 7 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os valores de Bmax e Kd no <i>binding</i> de 3H-NMS (M1+M2-símile) em corpo estriado de rato	107

PROTOCOLO IV

Tabela 1 -	Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos e sua associação sobre os receptores muscarínicos (M1+M2-símile) em corpo estriado de rato	120
Tabela 2 -	Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos e sua associação sobre os receptores dopaminérgicos (D1-símile) em corpo estriado de rato	124
Tabela 3 -	Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos e sua associação sobre os receptores	

dopaminérgicos (D2-símile) em corpo estriado de rato	125
--	-----

PROTOCOLO V

Tabela 1 -	Efeito da cocaína sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS (M1+M2-símile) em corpo estriado de rato	140
Tabela 2 -	Efeito da cocaína sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS (receptores M1 e M2-símile) em corpo estriado de rato	141
Tabela 3 -	Efeito da cocaína sobre o <i>binding</i> 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol em corpo estriado de rato	142
Tabela 4 -	Efeito da cocaína sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS, 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol em homogenatos de corpo estriado de rato (experimento <i>in vitro</i>)	143
Tabela 5 -	Efeito da administração repetida de cocaína nos receptores muscarínicos e dopaminérgicos D1 e D2-símile sobre os valores de Bmax e Kd em corpo estriado de rato	144

PROTOCOLO VII

Tabela 1 -	Efeito da cocaína sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor e corpo estriado de rato.	177
------------	---	-----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 -	Vias dopaminérgicas no SNC	08
Figura 2 -	Vias colinérgicas no SNC	21

PROTOCOLO I

Figura 1 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a atividade locomotora no campo aberto	62
Figura 2 -	Efeito de agonista e antagonista muscarínico sobre a atividade locomotora no campo aberto	63
Figura 3 -	Efeito da cocaína sobre a atividade locomotora (campo aberto)	64
Figura 4 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos no teste de catalepsia	65
Figura 5 -	Efeito de agonista e antagonista muscarínico e dopaminérgico no teste de catalepsia	66

PROTOCOLO II

Figura 1 -	Representação gráfica de Scatchard do <i>binding</i> de 3H-NMS em córtex motor de ratos controles e tratados com mazindol ou pimozida associada com mazindol	85
Figura 2 -	Representação gráfica de Scatchard do	

<i>binding</i> de 3H-NMS em córtex motor de ratos tratados com pimozida, apomorfina ou pimozida associado à apomorfina	86
--	----

PROTOCOLO IV

Figura 1 - Efeito do carbacol e atropina em diferentes doses sobre o <i>binding</i> de 3H-NMS em corpo estriado de rato	121
Figura 2 - Efeito do carbacol e atropina em diferentes doses sobre o <i>binding</i> de 3H-espiroperidol em corpo estriado de rato	126
Figura 3 - Efeito do carbacol e atropina sobre o <i>binding</i> de 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol em corpo estriado de rato	127

PROTOCOLO VI

Figura 1 - Efeito da administração de mazindol e pimozida, sozinhos ou associados sobre os níveis de AMPc em córtex motor e corpo estriado de rato	156
Figura 2 - Efeito da administração de carbacol e atropina, sozinhos ou associados com pimozida ou mazindol, respectivamente, sobre os níveis de AMPc em córtex motor de rato	157
Figura 3 - Efeito da administração de carbacol e atropina, sozinhos ou associados com pimozida ou mazindol, respectivamente,	

	sobre os níveis de AMPc em corpo estriado de rato	158
Figura 4 -	Efeito da administração de mazindol e pimizida, sozinhos ou associados sobre os níveis de GMPc em córtex motor e corpo estriado de rato	159

PROTOCOLO VII

Figura 1 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor de rato	173
Figura 2 -	Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de rato	174
Figura 3 -	Efeito do carbacol e atropina sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor de rato	175
Figura 4 -	Efeito do carbacol e atropina sobre a atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de rato	176

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	Localização anatômica dos receptores dopaminérgicos no SNC	09
QUADRO 2 -	Precusores e enzimas necessárias para a síntese de dopamina, enzimas metabolizadoras, metabólitos, agonistas e antagonistas seletivos e segundos mensageiros	12
QUADRO 3 -	Localização anatômica dos receptores muscarínicos no SNC	22
QUADRO 4 -	Precusores e enzimas necessárias para a síntese de acetilcolina, enzimas metabolizadoras, metabólitos, agonistas e antagonistas seletivos e segundos mensageiros	23
QUADRO 5 -	Drogas utilizadas com respectivas doses e vias de administração	35
QUADRO 6 -	Drogas utilizadas em associação	36
QUADRO 7 -	Resumo esquemático do método de determinação dos níveis de AMPc	48
QUADRO 8 -	Resumo esquemático do método de determinação dos níveis de GMPc	50
QUADRO 9 -	Resumo esquemático do método de determinação da atividade acetilcolinesterásica	52

ABREVIATURAS

- 4-DAMP:** metil-iodeto de 4-difenilacetoxi-N-metilpiperidina
- AFDX-116:** 11-[2-[(dietilamino)-metil-1-piperidinil]acetil-5,11-dihidro-6H-pirido-[2,3b) [1,4]benzodiazepine-6)
- 3H-NMS:** 3H-N-metilescopolamina
- 3H:** hidrogênio tritiado
- 5-HT:** 5-hidroxitriptamina (serotonina)
- 7-OH-DPAT:** 7-hidroxi-2 (di-N-propilamino) tetralina
- AChE:** acetilcolinesterase
- AMPC:** 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
- ANOVA:** Análise de Variância
- apo 1:** apomorfina 1 mg/kg, i.p.
- atr 5:** atropina 5 mg/kg, v.o.
- atr 10:** atropina 10 mg/kg, v.o.
- atr 20:** atropina 20 mg/kg, v.o.
- ATV:** área tegmentar ventral
- BDB:** banda diagonal de Brocca
- BSA:** (*bovine seric albumine* = albumina sérica bovina)
- CAT:** colina acetiltransferase
- cbc 5:** carbacol 5 mg/kg, v.o.
- cbc 10:** carbacol 10 mg/kg, v.o.
- cbc 20:** carbacol 20 mg/kg, v.o.
- CE:** corpo estriado
- CEBRID:** Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas
- CM:** córtex motor
- coc 5:** cocaína 5 mg/kg, i.p.
- coc 10:** cocaína 10 mg/kg, i.p.

coc 20: cocaína 5 mg/kg, i.p.

Complexo Gs: proteínas G estimulatórias

Complexo Gi: proteínas G inibitórias

COMT: catecol-O-metil-transferase

DA: dopamina

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

GMPc: 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico

HHISiD: hexahidrosiladifenidol

HVA: ácido homovanílico

i.p.: intraperitoneal

LCR: líquido céfalo-raquidiano

maz 10: mazindol 10 mg/kg, v.o.

NE: norepinefrina

PI: fosfoinosítídeos

pim 10: pimozida 10 mg/kg, v.o.

pim 20: pimozida 20 mg/kg, v.o.

Proteína G: proteína transdutora do sinal ligada ao GTP

PKC: proteína cinase C

PZ: pirenzepina

RNA_m: ácido ribonucleico mensageiro

SCH 23390: 7- cloro - 2,3,4,5-tetrahydro-3-metil-5-fenil-1H-3-benzazepina-7-ol

SKF 38393: 2,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihidroxi-1-fenil-1H-3-cloridrato de benzazepina

SNC: sistema nervoso central

sul 100: sulpirida 100 mg/kg, v.o.

TDA: transportador de dopamina

TO: tubérculo olfatório

v.o.: via oral

RESUMO

**Interação Dopamina-Acetilcolina - Ação de Drogas que
Atuam nos Sistemas Dopaminérgico e Colinérgico
em Córtex Motor e Corpo Estriado de Rato**
Doutorado em Farmacologia - UFC - 1997
Francisca Cléa Florenço de Sousa

Neste trabalho foram estudadas as interações entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico em córtex motor e corpo estriado de rato. As seguintes drogas foram utilizadas: mazindol e cocaína (agonistas dopaminérgicos indiretos), apomorfina (agonista dopaminérgico D1/D2-símile), pimizida e sulpirida (antagonistas D2-símile), carbacol (agonista muscarínico M2-símile) e atropina (antagonista muscarínico M1/M2-símile). As interações foram investigadas em alguns parâmetros: densidade de receptores muscarínicos (M1+M2-símile, M1 e M2-símile) e dopaminérgicos (D1 e D2-símile); níveis de nucleotídeos cíclicos (AMPC e GMPc); atividade da acetilcolinesterase; e comportamento (campo aberto e catalepsia).

Os resultados mostraram que existem alterações não somente em corpo estriado, como também em córtex motor de ratos. Em córtex motor, o mazindol e a apomorfina aumentaram a densidade de receptores muscarínicos, preferencialmente sobre os receptores M1-símile. O aumento na densidade de receptores induzido por estas drogas foi bloqueado pela pimizida.

Em corpo estriado, de modo similar ao que ocorreu em córtex motor, agonistas dopaminérgicos (mazindol e apomorfina e incluindo também cocaína) aumentaram a densidade de receptores muscarínicos. Do mesmo modo, o carbacol e a atropina aumentaram a densidade de receptores dopaminérgicos, preferencialmente D1-símile. A associação de pimizida e carbacol causou aumento significativo dos níveis de AMPC em corpo estriado, alteração esta não observada quando as drogas foram administradas isoladamente. Em córtex motor, a atropina diminuiu os níveis de AMPC, efeito que não foi observado com esta droga na presença do mazindol.

O mazindol diminuiu a atividade da acetilcolinesterase em corpo estriado, efeito este bloqueado pelo pimizida que sozinha não apresentou efeito significativo. Além disto, o mazindol aumentou a atividade locomotora e quando associado à atropina este efeito foi potencializado. Por outro lado, a pimizida induziu nos animais um estado cataléptico que não foi observado quando a droga foi administrada na presença do carbacol.

Estes estudos evidenciaram a existência de uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico que dependendo do parâmetro analisado e da área estudada pode ocorrer de maneira positiva ou negativa.

ABSTRACT

**Dopamine and Acetylcholine Interaction - Drugs Actions
in the Dopaminergic and Cholinergic Systems
in Rat Cortex Motor and Striatum**
PhD in Pharmacology - UFC - 1997
Francisca Cléa Florenço de Sousa

In the present paper, the interaction between dopaminergic and cholinergic systems in the rat motor cortex and striatum was studied. The following drugs were used: mazindol and cocaine (indirect dopaminergic agonists), apomorphine (a non-selective dopaminergic agonist), pimoziada and sulpirida (D2 antagonists), carbachol (muscarinic agonist of the M2-like subtype), and atropine (a non selective muscarinic antagonist).

The interactions were investigated on the following parameters: muscarinic (M1 plus M2-like, M1 or M2-like) and dopaminergic (D1 or D2-like) receptors densities; cyclic nucleotide levels (cAMP and cGMP); acetylcholinesterase activity and behavior (open field and catalepsy).

The results showed changes on the above parameters not only on the striatum but also on the rat motor cortex. Thus, in the motor cortex, mazindol and apomorphine increased the muscarinic receptor density. The effect was predominant on M1-like receptors, and blocked by pimoziada.

Similarly, in the striatum, dopaminergic agonists (mazindol, apomorphine and cocaine) caused an increase in the muscarinic receptor density. A dopaminergic receptor upregulation was also observed after carbachol and atropine treatments, and this effect occurred preferentially on D1-like receptors.

The cyclic nucleotide levels were also altered. In the striatum, pimoziada and carbachol increased significantly cAMP levels only when administered in association. In the motor cortex, atropine decreased cAMP levels, and this effect was not seen in the presence of mazindol.

The observed decrease in AChE activity caused by mazindol was blocked by pimoziada which did not cause any effect by itself. Mazindol also increased locomotor activity and the effect was potentiated by atropine. On the other hand, pimoziada-induced catalepsy was not observed in the presence of carbachol.

This work emphasizes dopaminergic versus muscarinic relationships which may be positive or negative depending on the parameters studied.

**Dopamine and Acetylcholine Interaction - Drugs Actions
in the Dopaminergic and Cholinergic Systems
in Rat Cortex Motor and Striatum**
PhD in Pharmacology - UFC - 1997
Francisca Cléa Florenço de Sousa

In the present paper, the interaction between dopaminergic and cholinergic systems in the rat motor cortex and striatum was studied. The following drugs were used: mazindol and cocaine (indirect dopaminergic agonists), apomorphine (a non-selective dopaminergic agonist), pimoziada and sulpirida (D2 antagonists), carbachol (muscarinic agonist of the M2-like subtype), and atropine (a non selective muscarinic antagonist).

The interactions were investigated on the following parameters: muscarinic (M1 plus M2-like, M1 or M2-like) and dopaminergic (D1 or D2-like) receptors densities; cyclic nucleotide levels (cAMP and cGMP); acetylcholinesterase activity and behavior (open field and catalepsy).

The results showed changes on the above parameters not only on the striatum but also on the rat motor cortex. Thus, in the motor cortex, mazindol and apomorphine increased the muscarinic receptor density. The effect was predominant on M1-like receptors, and blocked by pimoziada.

Similarly, in the striatum, dopaminergic agonists (mazindol, apomorphine and cocaine) caused an increase in the muscarinic receptor density. A dopaminergic receptor upregulation was also observed after carbachol and atropine treatments, and this effect occurred preferentially on D1-like receptors.

The cyclic nucleotide levels were also altered. In the striatum, pimoziada and carbachol increased significantly cAMP levels only when administered in association. In the motor cortex, atropine decreased cAMP levels, and this effect was not seen in the presence of mazindol.

The observed decrease in AChE activity caused by mazindol was blocked by pimoziada which did not cause any effect by itself. Mazindol also increased locomotor activity and the effect was potentiated by atropine. On the other hand, pimoziada-induced catalepsy was not observed in the presence of carbachol.

This work emphasizes dopaminergic versus muscarinic relationships which may be positive or negative depending on the parameters studied.

INTRODUÇÃO GERAL

1 - Sistema dopaminérgico

Em 1958, Arvid Carlsson, identificou a dopamina como um neurotransmissor independente. Cinco anos depois foi descoberto que a degeneração dos neurônios dopaminérgicos era a base etiológica da doença de Parkinson e que este neurotransmissor estava envolvido no modo de ação das drogas antipsicóticas (Grace, 1993). A partir daí, o sistema dopaminérgico foi amplamente estudado para melhor entender este sistema neuroquímico importante, mas tão complexo.

1.1 - Regulação dopaminérgica

Um resumo do sistema dopaminérgico, no que se refere a síntese de dopamina, metabolismo, agonistas e antagonistas seletivos bem como segundos mensageiros envolvidos está sumarizado no **Quadro 2**.

A neurotransmissão dopaminérgica é controlada por mecanismos envolvendo receptores pós-sinápticos e transdução do sinal, bem como regulação pré-sináptica do neurotransmissor dopamina. O controle pré-sináptico da concentração de dopamina sináptica envolve a regulação da síntese e liberação de dopamina e a atividade do transportador de dopamina (TDA).

O TDA é membro de uma família de proteínas transportadoras de membrana que são dependentes de sódio, apresentam um transporte de alta afinidade e são substrato-específicos (Amara & Kuhar, 1993; Uhl,

1992). A recaptação de dopamina pelos TDA é a etapa limitante para a ativação dopaminérgica.

1.2 - Vias dopaminérgicas no SNC

A dopamina está presente na maioria das regiões do SNC, originando-se de longos axônios que partem da substância negra e área tegmentar ventral e inervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (Conn *et al.*, 1995).

O sistema dopaminérgico compreende três vias neuronais principais: nigroestriatal, mesocorticolímbica e tuberoinfundibular. A via nigroestriatal, responsável por 75 % da dopamina cerebral é constituída por neurônios que se projetam da substância negra para o corpo estriado. Esta via tem importante papel no controle da locomoção. A via dopaminérgica mesocorticolímbica é composta de neurônios da área tegmentar ventral que se conectam com regiões do sistema límbico, principalmente o núcleo *accumbens*. Está envolvida no controle da estabilidade emocional. A via tuberoinfundibular se origina de neurônios que partem do hipotálamo para a hipófise. A dopamina secretada por estes neurônios é transportada para a hipófise onde regula a secreção de prolactina. Esta via influencia a lactação e a fertilidade (Civelli *et al.*, 1993).

Já foi demonstrado anteriormente que a degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal leva a uma depleção de dopamina nos cérebros de pacientes com a doença de Parkinson (Poirier & Sourkes, 1965). O tratamento para a doença de Parkinson consiste em terapias de reposição dos níveis centrais de dopamina (Hornykiewicz, 1966).

A dopamina está também envolvida na patogênese das psicoses, em particular, da esquizofrenia. A via mesocorticolímbica é a principal via envolvida na etiologia das psicoses. (Carlsson, 1988; Carlsson & Lindqvist, 1963; Creese *et al.*, 1976).

Uma representação das vias dopaminérgicas no SNC está demonstrada na **Figura 1**.

1.3 - Receptores dopaminérgicos

1.3.1 - Classificação

A dopamina exerce seus efeitos biológicos através da interação com receptores específicos. Em 1979, Keabian & Calne mostraram que a dopamina exercia seus efeitos através de sua ligação com dois receptores específicos, chamados D1 e D2, os quais apresentavam diferenças farmacológicas e biológicas, bem como distribuição anatômica diferente.

As diferenças farmacológicas baseavam-se no fato de que enquanto o receptor D1 se ligava a uma benzazepina, o antagonista seletivo SCH 23390, o receptor D2 se ligava com alta afinidade a butirofenonas, como espiperona e haloperidol. Estes dois receptores também exerciam seus efeitos através de ações biológicas diferentes, se acoplando e ativando diferentes complexos de proteínas G. O receptor D1 interagia com o complexo Gs para ativar a adenilil ciclase, aumentando a formação de AMPc, enquanto o receptor D2 interagia com o complexo Gi, inibindo a adenilil ciclase e conseqüentemente inibindo a produção de AMPc. Estes dois receptores apresentam uma

distribuição anatômica difusa no SNC, mas diferem proporcionalmente em áreas cerebrais específicas.

Durante 10 anos, esta classificação em dois subtipos de receptores explicava a maioria das atividades do sistema dopaminérgico. Recentemente foram descobertos novos subtipos, que entretanto, por algum tempo ainda foram refutados pois pareciam representar estados de afinidade diferentes dos receptores D1 e D2 (Andersen *et al.*, 1990; Leff & Creese, 1985). Contudo, com a aplicação de tecnologia do DNA recombinante estes novos receptores estão sendo caracterizados molecularmente, mudando drasticamente a classificação dos receptores dopaminérgicos.

A clonagem do receptor D2 resultou do reconhecimento de sua ação inibitória sobre a adenilil ciclase. Conseqüentemente, este receptor deveria pertencer a uma família de supergenes de receptores acoplados às proteínas G (Dohlman *et al.*, 1987; Hall, 1987). O uso de técnicas de clonagem baseada na sequência homóloga que deve existir entre receptores acoplados às proteínas G, levou à caracterização molecular do receptor D2.

O sucesso da clonagem do receptor D2 abriu as portas para a clonagem de outros receptores, logo sendo clonado o receptor D1 (Dearry *et al.*, 1990; Monsma *et al.*, 1990; Sunahara *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1990). A generalização da sequência homóloga dos receptores D2 permitiu a pesquisa de novos receptores. Sokoloff *et al.*, (1990) identificaram um novo receptor dopaminérgico, que tinha afinidade por ligantes D2, mas não por ligantes D1. Sua estrutura e características de *binding* (ligação) permitiu sua classificação como um novo receptor chamado D3. Posteriormente, foi clonado o receptor D4. A partir da

sequência homóloga do receptor D1 também foram caracterizados novos receptores tais como o receptor D5 humano e um receptor D1b no rato (Grandy *et al.*, 1991; Sunahara *et al.*, 1991; Tiberi *et al.*, 1991). Estes receptores apresentam características farmacológicas semelhantes ao receptor D1 e são capazes de estimular a atividade da adenilil ciclase. Com base nas suas respectivas sequências os receptores D5 humano e D1b de rato são equivalentemente os mesmos receptores.

A aplicação destas técnicas de *screening* por homologia levou, não somente a caracterização molecular dos receptores D1 e D2, mas também à caracterização molecular de três novos receptores: D3, D4 e D5. Estas descobertas têm importantes implicações médicas, considerando que as ações da maioria dos agonistas e antagonistas dopaminérgicos devem ser reavaliadas em vista da existência destes diferentes receptores (Civelli, 1995).

Os receptores D1 e D5 são 79% idênticos, mas são somente 40-45 % idênticos aos receptores D2, D3 e D4. Inversamente, os receptores D2, D3 e D4 são em torno de 75 % idênticos entre si. Assim os cinco receptores podem ser divididos em duas sub-famílias de receptores: D1 e D2-símile (Civelli, 1995).

Os receptores D1-símile se ligam com alta afinidade aos antagonistas D1, mas não aos antagonistas D2. Assim eles se ligam com alta afinidade a benzazepina SCH 23390, ligante protótipo para os receptores D1-símile e com baixa afinidade à butirofenona, espiperona. Diferentemente os receptores D2-símile se ligam eficientemente à espiperona, mas não o fazem assim com o SCH 23390. Estes receptores reconhecem a maioria dos neurolépticos (Civelli, 1995).

As atividades biológicas predominantes dos receptores D1 e D2 são a ativação e inibição da adenilil ciclase, respectivamente. Em células transfectadas, foi demonstrado que os receptores D1 e D5 estão relacionados a ativação da adenilil ciclase, sugerindo vias de indução de segundos mensageiros similares para os receptores D1-símile. Por outro lado, para os receptores D3 e D4 não foi completamente definido se eles ativam sistemas de segundos mensageiros (Civelli, 1995).

1.3.2 - Localização

Os receptores dopaminérgicos D1 e D2 são bem distribuídos em todo o SNC. RNAm de receptores D1 e D2 está presente em todas as regiões dopaminoceptivas do cérebro do rato (Fremeau *et al.*, 1991; Mansour *et al.*, 1990; Meador-Woodruff *et al.*, 1989; Meador-Woodruff *et al.*, 1991; Mengod *et al.*, 1989; Najlerahim *et al.*, 1989; Weiner & Brann, 1989). Níveis altos de RNAm para os receptores D1 e D2 estão presentes no caudado-putamen, núcleo *accumbens* e tubérculo olfatório, enquanto baixos níveis estão presentes no séptum, hipotálamo, e córtex. Também são encontrados RNAm para D2 na substância negra e área tegmentar ventral (onde o RNAm para D2 é encontrado em alto nível) e hipocampo. Nestas áreas não foram encontrados RNAm para receptores D1. Inversamente na amígdala é encontrado RNAm para D1, mas pouco ou nenhum RNAm para D2.

RNAm para os receptores D3, D4 e D5 está presente na maioria dos tecidos onde os receptores D1 e/ou D2 também são expressos. Entretanto, sua abundância relativa é em magnitude duas a três vezes menor do que o RNAm para os receptores D1 ou D2 (Sokoloff *et al.*, 1990; Van Tol *et al.*, 1991). Os receptores D3 e D4 são mais seletivamente associados com a região límbica do cérebro, região que

recebe impulsos provenientes da área tegmentar ventral e que está relacionada com funções cognitivas, emocionais e endócrinas. A localização do RNAm do receptor D5, contudo, é altamente específica, sendo encontrado somente no hipocampo, no hipotálamo, no núcleo parafascicular do tálamo, relacionando-se, portanto, com funções dopaminérgicas afetivas, neuroendócrinas ou aspectos relacionados à dor (Meador-Woodruff *et al.*, 1992). Também através de técnicas de hibridização *in situ* foi possível demonstrar que o RNAm para receptores D1 e D2 estão co-localizados em 26-40% do putamen-caudado (Meador-Woodruff *et al.*, 1991).

Através da técnica de *northern blot* foi demonstrado que há RNAm para os receptores D1 ou D3 fora do SNC (Sokoloff *et al.*, 1990; Zhou *et al.*, 1990). Por outro lado, foram encontrados altos níveis de RNAm para os receptores D2 na hipófise (Bunzow *et al.*, 1988) na glândula adrenal e também na retina. Interessantemente, foram encontradas atividade para RNAm de D1 e D2-símile nos rins e coração (Andersen *et al.*, 1990; Felder *et al.*, 1989). Nenhum RNAm dos receptores D2-símile clonados foi encontrado nos rins. Por outro lado, RNAm para D4 foi encontrado no coração (O'Malley *et al.*, 1992). Contudo, não foi detectado em quantidades significantes RNAm para receptores D1-símile no coração. Assim os receptores D4 e D5 são responsáveis pela reatividade encontrada nos rins e coração.

Um resumo da localização no SNC dos receptores dopaminérgicos está sumarizado no **Quadro 1**.

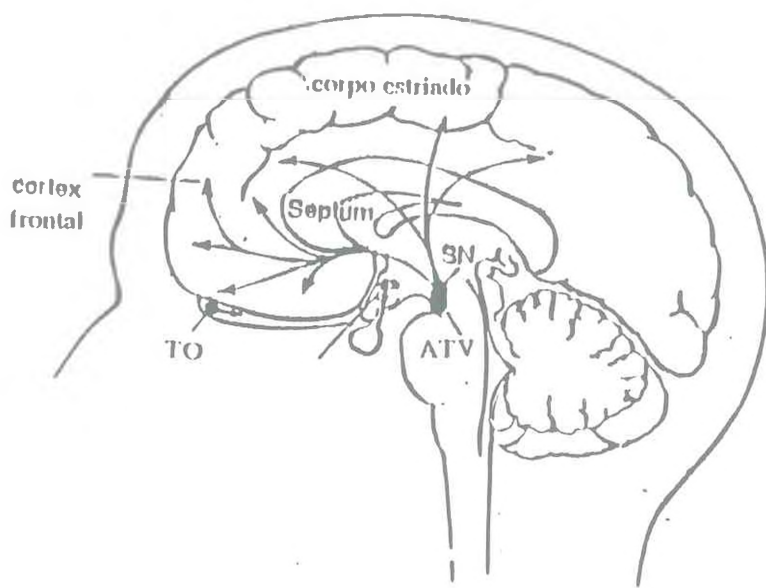


Figura 1 - Vias dopaminérgicas no SNC. Grupos celulares dopaminérgicos se projetam da substância negra (SN) para o corpo estriado. Corpos celulares próximos à substância negra na área tegmental ventral (ATV) projetam axônios para o séptum, córtex límbico (incluindo córtex frontal e cíngulo), amígdala, núcleo accumbens e tubérculo olfatório (TO) (Sundberg, 1994).

Quadro 1 - Localização anatômica dos receptores dopaminérgicos no SNC.

Subtipo	Localização
D1	corpo estriado núcleo <i>accumbens</i>
D5	hipocampo núcleo parafascicular do tálamo
D2	corpo estriado núcleo <i>accumbens</i> substância negra área tegmentar ventral
D3	substância negra área tegmentar ventral núcleo <i>accumbens</i> hipocampo
D4	córtex frontal hipocampo cerebelo

Sokoloff *et al.*, 1995.

1.3.3 - Perspectivas

A descoberta dos novos receptores de dopamina é muito importante para o entendimento do sistema dopaminérgico. A primeira perspectiva é saber se os agonistas ou antagonistas destes novos receptores podem ser de valor terapêutico semelhante aos antagonistas D2. Os receptores D3 e D4 apresentam duas particularidades similares. Eles se ligam à maioria dos neurolépticos com menos afinidade do que o receptor D2, sugerindo que o tratamento com neurolépticos pode não afetar suas atividades (Civelli, 1995).

Além do mais, os receptores D4 são encontrados predominantemente no sistema límbico e estão relativamente ausentes no sistema nigroestriatal, sendo assim, preferencialmente, associados com a etiologia das psicoses ao invés de disfunções locomotoras. O receptor D4 ainda apresenta uma característica de *binding* com a clozapina com uma afinidade correspondente à sua concentração terapêutica. Embora a clozapina possa se ligar a outros receptores, sua afinidade pelo receptor D4 poderia explicar sua atividade no sistema dopaminérgico. Conseqüentemente, o efeito atípico da clozapina pode ser devido à ausência relativa do receptor D4 nos núcleos da base. Se esta hipótese for válida, será necessária a síntese de antagonistas específicos.

O receptor D5 também pode ter interesse terapêutico. Ele está presente em pequenas quantidades e é restrito a poucas áreas do SNC. Sua importância é devido à sua presença no rim, cuja função é melhorada pela dopamina nos casos de choque e baixo fluxo cardíaco. Assim, o agonista D5 com baixa afinidade por outros receptores catecolaminérgicos poderia ser de grande valor.

Em suma, o estudo dos receptores dopaminérgicos é muito importante para o entendimento do sistema dopaminérgico e de suas implicações fisiológicas, bem como para o esclarecimento e tratamento das várias doenças a este sistema vinculadas.

Quadro 2 - Precursores e enzimas necessárias para a síntese de dopamina, enzimas metabolizadoras, metabólitos, agonistas e antagonistas seletivos e segundos mensageiros

DOPAMINA (DA)			
Precusores:		tirosina (a) → L-dihidroxifenilalanina (L-dopa) (b) → dopamina	
Enzimas sintetizadoras :		(a) tirosina hidroxilase; (b) L-aminoácido descarboxilase (dopa descarboxilase)	
Enzimas metabolizadoras:		MAO (monoamino-oxidase) COMT (catecol-O-metil transferase)	
Metabólitos:		DOPAC (ácido 3,4 dihidroxifenilacético) HVA (ácido homovanílico)	
Subtipos de receptores	Agonistas	Antagonistas	Segundos mensageiros
D1	SFK 38396	SCH 23390	↑ AMPc
D2	Quinpirole	Espiperona Sulpirida	↓ AMPc Canais de K ⁺
D3	7-OH-DPAT	AJ-76 LH 232	?
D4	dopamina	Clozapina	?
D5	dopamina	SCH 23390	↑ AMPc

Civelli, O. *Psychopharmacol.*, 1995.

Sunahara, R.K. *et al.*, *Nature* 350, 1991.

Van Tol, H.H.M *et al.*, *Nature* 350, 1991.

2 - Sistema colinérgico muscarínico

A acetilcolina é o neurotransmissor responsável pela transferência de impulsos dos neurônios colinérgicos para células nervosas colinoceptivas e para células de tecidos inervados (Tucek *et al.*, 1993). O sistema colinérgico possui um importante papel nos processos de memória e aprendizado (Ohno *et al.*, 1993).

2.1 - Vias colinérgicas no SNC

As vias colinérgicas são filogeneticamente antigas. Sua presença é identificada por marcadores tais como acetilcolinesterase (AChE), receptores muscarínicos e nicotínicos e colina acetiltransferase (CAT) (Mesulam, 1995). Os neurônios colinérgicos são bem distribuídos em todo o SNC de mamíferos e existem como projeções de neurônios e interneurônios.

Há oito maiores grupos celulares que se projetam para estruturas do SNC. A nomenclatura Ch1 - Ch8 é usada para classificar os neurônios colinérgicos nestes oito grupos celulares (Mesulam, 1995).

De acordo com esta nomenclatura, Ch1 designa as células colinérgicas associadas com o núcleo septal medial, Ch2 com o núcleo vertical da banda diagonal, Ch3 com a ramificação horizontal do núcleo da banda diagonal, Ch4 com o núcleo basal de Meynert, Ch5 com o núcleo do pedúnculo pontino no tronco cerebral rostral, Ch6 com o núcleo tegmental laterodorsal também no tronco cerebral rostral, Ch7 associados à habenula medial e Ch8 àquelas no núcleo parabigeminal (Mesulam, 1995).

Experimentos usando marcadores em várias espécies animais, mostram que Ch1 e Ch2 apresentam a maior inervação colinérgica para o hipocampo, Ch3 para o tubérculo olfatório, Ch4 para o córtex cerebral e amígdala, Ch5 e Ch6 para o tálamo, Ch7 para o núcleo interpeduncular, e Ch8 para o colículo superior. Há também conexões de Ch1-Ch4 e Ch8 para o tálamo e de Ch5-Ch6 para o córtex cerebral (Mesulam, 1995).

Os núcleos da base apresentam ampla inervação colinérgica. A inervação colinérgica no corpo estriado é mais intrínseca, vindo de interneurônios colinérgicos. O corpo estriado também apresenta uma inervação colinérgica em menor extensão de Ch4 e Ch5-Ch6. A inervação colinérgica de alguns componentes dos núcleos da base, tais como o globo pálido, o núcleo subtalâmico e a substância *pars compacta* da substância negra é exclusivamente extrínseca, provavelmente se originando em grande extensão de Ch5-Ch6 (Mesulam, 1995).

No cérebro de roedores, há interneurônios colinérgicos que representam acima de 30 % da inervação colinérgica do córtex cerebral. Tais interneurônios não foram encontrados no córtex cerebral de primatas adultos ou no tálamo de qualquer outra espécie. Portanto, a inervação colinérgica do córtex cerebral e tálamo de primatas adultos é exclusivamente extrínseca (Mesulam, 1995).

Entre as projeções de neurônios, dois grupos celulares proeminentes receberam maior atenção nos últimos anos (Reiner & Fibiger, 1995): neurônios colinérgicos do cérebro anterior (localizados no septum medial, ramificações vertical e horizontal da banda de Brocca e o núcleo basal de Meynert) e neurônios colinérgicos do tronco

cerebral (encontrados no núcleo laterodorsal e tegmental do pedúnculo do pontino).

Os neurônios colinérgicos do cérebro anterior basal inervam o córtex cerebral, enquanto os neurônios colinérgicos do tronco cerebral primariamente inervam o tálamo. Neurônios colinérgicos no séptum medial/ramificação vertical se projetam primariamente para o hipocampo, enquanto os terminais axônicos dos neurônios colinérgicos encontrados na ramificação horizontal e núcleo basal são dirigidos primariamente para o córtex (Reiner & Fibiger, 1995).

Uma representação das vias colinérgicas no SNC está apresentada na **Figura 2**.

2.2 - Receptores muscarínicos

Há 80 anos atrás Dale (1914) dividiu as ações da acetilcolina em muscarínicas e nicotínicas. Estes efeitos são mediados por duas classes de receptores distintas que possuem pouca coisa em comum, a não ser a habilidade de se ligar à acetilcolina (Ehlert *et al.*, 1995).

Os receptores muscarínicos são amplamente distribuídos em todo o corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autonômico (Lefkowitz *et al.*, 1996). No cérebro, os receptores muscarínicos são importantes na memória (Drachman & Leavitt, 1974; Safer & Allen, 1971) e na patofisiologia de doenças afetivas (Janowsky *et al.*, 1972; Janowsky *et al.*, 1973; Sitaram *et al.*, 1980) e esquizofrenia (Davis *et al.*, 1975; Karson *et al.*, 1991; Tandon *et al.*, 1991; Tandon *et al.*, 1992). Devido ao seu possível papel na função cognitiva os

receptores muscarínicos são alvo de pesquisa no caso da doença de Alzheimer (Richelson, 1995).

Até o início de 1980 os receptores muscarínicos pareciam representar uma classe parcialmente homogênea de receptores, embora evidências farmacológicas contrárias já existissem desde 1950. No final de 1980, com a ajuda de técnicas de biologia molecular foram identificados 5 subtipos de receptores muscarínicos (Bonner *et al.*, 1987; Kubo *et al.*, 1986a; Kubo *et al.*, 1986b; Liao *et al.*, 1989; Peralta *et al.*, 1987a; Peralta *et al.*, 1987b).

2.2.1 - Localização dos subtipos de receptores muscarínicos

O subtipo M1 exibe alta afinidade para a pirenzepina e é abundante no cérebro e gânglio simpático (Ehlert & Tran, 1990; Kashiara *et al.*, 1992; Yasuda *et al.*, 1992). O subtipo M2 tem alta afinidade para AF-DX 116 e galamina e é expresso no miocárdio de mamíferos, onde quase toda a população de receptor M2 está localizada (Kashihara *et al.*, 1992). O receptor M2 também apresenta uma densidade uniforme, embora baixa, no cérebro (Ehlert & Tran, 1990; Yasuda *et al.*, 1992), e representa a maior concentração de receptor muscarínico no músculo liso (Candell *et al.*, 1990).

O receptor M3 tem alta afinidade para HHSiD e 4-DAMP e representa a maior concentração de receptores muscarínicos nas glândulas exócrinas (Kashihara *et al.*, 1992; Pedder *et al.*, 1991). Também se apresenta embora em pequena densidade no músculo liso (Candell *et al.*, 1990) e no cérebro (Yasuda *et al.*, 1992). O receptor M4 também tem uma alta afinidade para 4-DAMP e HHSiD (Kashihara *et al.*, 1992). Este receptor representa a maior concentração de receptores

muscarínicos do pulmão de coelhos (Lazareno *et al.*, 1990), mas não em humanos (Bloom *et al.*, 1988) e ratos (Fryer *et al.*, 1990). Também apresenta uma densidade abundante em várias regiões do cérebro, particularmente no corpo estriado e tubérculo olfatório (Yasuda *et al.*, 1992). O receptor M5 tem uma alta afinidade para antagonistas não-M2, como 4-DAMP e HHSiD e uma baixa afinidade para AF-DX 116 (Kashihara *et al.*, 1992). Não se expressa em tecidos periféricos, e representa menos do que 2 % da densidade de receptores muscarínicos em várias regiões do cérebro (Yasuda *et al.*, 1992).

Estudos de hibridização *in situ* (Buckley *et al.*, 1988) demonstram que a relativa abundância de RNAm para os subtipos de receptores M1 e M4 são maiores em várias estruturas cerebrais tais como córtex, hipocampo e putamen-caudado, declinando em áreas mais caudais do cérebro. A abundância de RNAm para M3 é maior no córtex cerebral e hipocampo, sendo baixa no putamen-caudado e regiões mais caudais do cérebro. Diferentemente, o RNAm para o receptor M2 apresenta uma distribuição uniforme, mas relativamente baixa em todo o cérebro.

Um resumo da localização no SNC dos receptores muscarínicos está sumarizado no **Quadro 3**.

2.2.2 - Mecanismos de transdução do sinal

Parece que as propriedades estruturais dos subtipos de receptores muscarínicos determinam em parte o mecanismo de transdução do sinal. Presumivelmente, esta especificidade é consequente do acoplamento seletivo dos subtipos de receptores às proteínas G. Estudos nos quais os genes de receptores individuais foram tranfectados em células

previamente demonstradas não conter receptores muscarínicos, mostram que os subtipos M1, M3 e M5 estimulam a hidrólise de fosfoinosítídeos, enquanto a ativação dos subtipos M2 e M4 causa uma inibição da adenilil ciclase sensível à toxina pertussis (Ashkenazi *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1988; Lai *et al.*, 1991; Liao *et al.*, 1989; Peralta *et al.*, 1988).

Na maioria dos casos, a hidrólise de fosfoinosítídeos induzida pelos receptores muscarínicos é insensível à toxina pertussis. Entretanto, em algumas células a ativação dos receptores M1 induziu uma hidrólise de fosfoinosítídeos sensível à toxina pertussis (Mei *et al.*, 1991). Destas informações se conclui que pelo menos dois tipos de proteínas G estão envolvidas na hidrólise de fosfoinosítídeos induzida pelo receptores muscarínicos.

Pelo menos em termos gerais, os receptores muscarínicos podem ser divididos em duas categorias dependendo do efeito produzido: inibição da adenilil ciclase (M2 e M4) ou estimulação da hidrólise de fosfoinosítídeos (M1, M3 e M5).

O padrão de acoplamento seletivo do receptor visto em células transfectadas é também aparente em vários tecidos expressando uma mistura de subtipos de receptores. Por exemplo, a hidrólise de fosfoinosítídeos no córtex cerebral de rato é potencialmente antagonizada pelo antagonista M1-seletivo, pirenzepina (Exton, 1990). Em músculo liso, esta hidrólise é potencialmente antagonizada por HHSiD, mas não pela pirenzepina, sugerindo o envolvimento dos receptores M3 (Bersudsky *et al.*, 1992). De forma intrigante, agonistas muscarínicos inibem a adenilil ciclase em corpo estriado enquanto este tipo de resposta não ocorre com os receptores M1, M2 e M3 (Ehlert *et al.*, 1990). Consequentemente, é possível que esta resposta seja mediada

pelo receptor M4, considerando a grande abundância destes receptores nesta região.

Embora a divisão dos subtipos de receptores em duas categorias seja inerentemente precisa, algumas observações empíricas não se adaptam a este esquema. Por exemplo, foi observado que receptores M2 e M4 estimulam a hidrólise de fosfoinosítídeos, embora a magnitude desta resposta seja fraca, e somente ocorra em células expressando alta densidade destes receptores (Peralta *et al.*, 1988). Alguns estudos também mostram que os receptores M1, M3 e M5 estimulam o acúmulo de AMPc em células intactas (Lai *et al.*, 1992; Peralta *et al.*, 1988).

Em células intactas existem mecanismos de transdução do sinal mais complicados devido ao acúmulo de mediadores intracelulares tais como cálcio. Por exemplo, os receptores M1 e M3 estimulam o acúmulo de AMPc em células AL9 intactas e íris de bovino, respectivamente, e este efeito parece ser dependente da hidrólise de fosfoinosítídeos, o que causa uma mobilização de cálcio e uma ativação da adenilil ciclase cálcio-calmodulina dependente (Felder *et al.*, 1989; Tachado *et al.*, 1994). Observações similares foram feitas em células SH-SY5Y (Nakagawa-Yagi *et al.*, 1991). Entretanto, Baumgold *et al.*, (1992) mostraram que em células SK-N-SH de neuroblastoma humano o receptor muscarínico é capaz de estimular o acúmulo de AMPc independente dos níveis de cálcio intracelulares.

Alguns investigadores sugeriram que o acúmulo de AMPc estimulado pelos receptores muscarínicos pode ser mediado por mecanismos envolvendo GMPc ou PKC (proteína quinase C) bem como cálcio (Jansson *et al.*, 1991; Tateishi *et al.*, 1992; Warhurst *et al.*, 1994; Watson *et al.*, 1990).

2.2.3 - Perspectivas

O estudo dos receptores muscarínicos é de suma importância no esclarecimento de algumas patologias. A grande abundância de receptores M1 no córtex e no hipocampo sugere que talvez agonistas que penetrem no cérebro possam ser eficazes no tratamento de condições neurológicas associadas com hipofunção colinérgica no cérebro (ex.: doença de Alzheimer). Assim como a grande abundância de receptores M4 no putamen-caudado sugere que antagonistas muscarínicos seletivos que centralmente ativam M4 podem ser úteis no tratamento do parkinsonismo. Tais agentes devem ser deficientes de efeitos colaterais de antagonistas muscarínicos clássicos que bloqueiam respostas mediadas por M3 e M4 no sistema nervoso parassimpático. Estes antagonistas M4 seletivos que atuam centralmente podem ser úteis no parkinsonismo sozinhos ou como auxiliares no tratamento com levodopa (Ehlert *et al.*, 1995).

Um resumo do sistema colinérgico muscarínico está representado no **Quadro 4**.

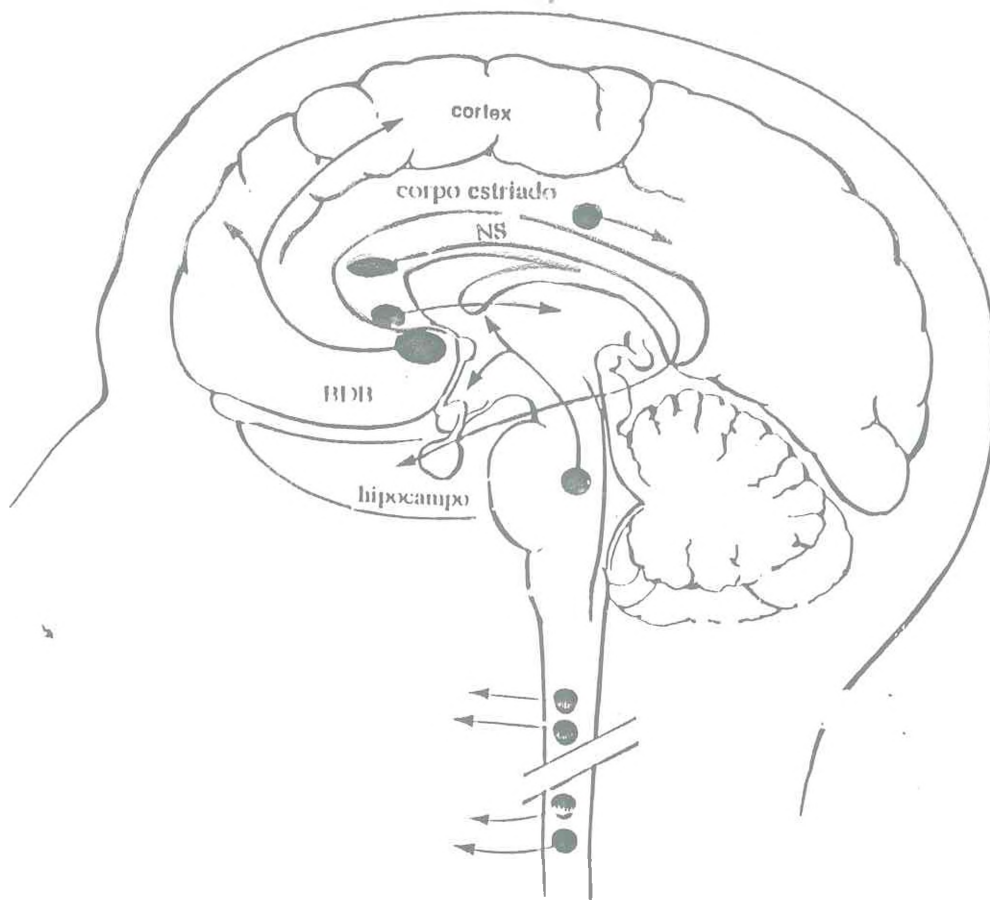


Figura 2 - Vias colinérgicas no SNC. Grupos celulares colinérgicos são encontrados no núcleo septal (NS), banda diagonal de Broca (BDB), núcleo basal e pequenos interneurônios no corpo estriado (Sundberg, 1994).

Quadro 3 - Localização anatômica dos receptores muscarínicos no SNC

Subtipo	Localização
M1	(abundante no cérebro) hipocampo (↑) córtex frontoparietal (↑)
M2	(↓)
M3	córtex (↑) hipocampo (↑) corpo estriado (↓)
M4	córtex (↑) hipocampo (↑) corpo estriado (↑)
M5	↓ (< 2 %)

↑ = alta densidade; ↓ = baixa densidade

Ehlert *et al.*, 1995.

Quadro 4 - Precusores e enzimas necessários para a síntese de acetilcolina, enzimas metabolizadoras, metabólitos, agonistas e antagonistas muscarínicos seletivos e segundos mensageiros

Acetilcolina (ACh)

Precusores	Colina e acetilcoenzima A (Acetil CoA)
Enzimas sintetizadoras:	Colina acetiltransferase (CAT)
Enzimas metabolizadoras:	Acetilcolinesterase (AChE) Butirilcolinesterase (BuChE)
Metabólitos:	Colina e acetato

Subtipos de receptor	Agonistas	Antagonistas	Segundos mensageiros
M1	Metacolina	irenzepina Telenzepina	Fosfoinosítídeos (PI)
M2	Metacolina	AF-DX 116 Galamina	↓ AMPc canais de K ⁺
M3	Metacolina	HHSiD 4-DAMP	Fosfoinosítídeos (PI)
M4	Metacolina	4-DAMP HHSiD Imbacina	↓ AMPc
M5	Metacolina	4-DAMP HHSiD	Fosfoinosítídeos (PI)

Ehlert *et al.*, *Psychopharmacol.* 1995.

3 - Interação dopamina-acetilcolina

Evidências neurofarmacológicas nas duas últimas décadas indicam uma interação entre a neurotransmissão dopaminérgica (dopamina) e colinérgica (acetilcolina) nos núcleos da base, especificamente no corpo estriado (Bertorelli *et al.*, 1992).

A interação entre estes dois sistemas de neurotransmissão é de tal forma importante que o desequilíbrio desta relação pode levar a algumas doenças já claramente demonstradas. A etiologia de algumas desordens dos núcleos da base, tais como doença de Parkinson e doença de Huntington, frequentemente são associadas ao desequilíbrio na interação entre elementos dopaminérgicos e colinérgicos na substância negra (Butcher *et al.*, 1982; Crawford *et al.*, 1982; Joh *et al.*, 1973).

A doença de Parkinson ocorre devido a uma degeneração dos núcleos da base (substância negra). Nesta doença, por exemplo, são observadas hipoatividade dopaminérgica e hiperatividade colinérgica. Portanto, os agonistas dopaminérgicos e antagonistas colinérgicos melhoram os sintomas da doença de Parkinson sugerindo que uma interação entre estes sistemas é crítica para a função normal do corpo estriado.

O corpo estriado é a estrutura que abrange maior parte dos núcleos da base (Alexander, 1986). Os neurotransmissores mais proeminentes são a dopamina e a acetilcolina, os quais são encontrados em altas concentrações nesta estrutura. Na realidade o corpo estriado é uma área do SNC de mamíferos que contém uma das mais altas concentrações de acetilcolina, bem como de marcadores colinérgicos, tais como colina acetiltransferase (CAT), enzima responsável pela

síntese de acetilcolina (Graybiel & Ragsdale, 1983). Estudos farmacológicos e neuroquímicos mostram um papel preponderante da acetilcolina no controle de funções extrapiramidais e disfunções associadas com os núcleos da base (McGeer, 1976).

A função dos neurônios colinérgicos estriatais é classicamente considerada como sendo controlada pela dopamina (Consolo *et al.*, 1992). As primeiras evidências indicavam que a estimulação dos receptores dopaminérgicos reduzia a liberação de acetilcolina, enquanto o bloqueio destes receptores, removia esta inibição, levando a um aumento da liberação de acetilcolina (McLennan & York, 1967; Scatton, 1982a,b; Stadler *et al.*, 1973).

Desde 1979 (Kebabian & Calne, 1979) foi mostrado que os efeitos da dopamina sobre a liberação de acetilcolina eram mediados pelos receptores dopaminérgicos D2, cujos recentes estudos de hibridização *in situ* combinados com estudos de imunocitoquímica usando colina acetiltransferase revelam que estão localizados na maioria dos neurônios colinérgicos estriatais do rato (Le Moine *et al.*, 1990).

Há pelo menos três localizações dos receptores dopaminérgicos D2 estriatais: (1) localização pré-sináptica nos terminais nigroestriatais; (2) localização pré-sináptica nos terminais corticoestriatais; e (3) localização pós-sináptica nos interneurônios estriatais ou neurônios externos (Filloux *et al.*, 1988; Kebabian & Calne, 1979). Várias evidências indicam que alguns destes interneurônios são colinérgicos (Zhou *et al.*, 1993).

Ligações diretas entre os terminais dopaminérgicos e os neurônios colinérgicos também foram demonstradas por microscopia eletrônica

(Kubota *et al.*, 1987). Através destas ligações os neurônios dopaminérgicos estriatais inibem os interneurônios colinérgicos.

Com o desenvolvimento de agentes químicos seletivos para receptores D1 (Iorio *et al.*, 1983), foi visto que a dopamina endógena pode também regular a função colinérgica estriatal através de um mecanismo mediado pelo receptor D1 (Consolo *et al.*, 1987; Fage & Scatton, 1986).

Assim, a dopamina exerce seus efeitos sobre o SNC estimulando pelo menos duas categorias de receptores designados como D1 e D2 (Kebabian & Calne, 1979). A dopamina agindo nos receptores D1 exerce um efeito sobre a liberação de acetilcolina *in vivo* oposto àquele resultante da ativação dos receptores D2. Ou seja, a ativação de receptores D1 estimula a liberação de acetilcolina e o bloqueio a reduz (Ajima *et al.*, 1990; Bertorelli & Consolo, 1990; Consolo *et al.*, 1987; Damsma *et al.*, 1990a; Fage & Scatton, 1986). Assim, D2 teria um efeito inibitório e D1 um efeito facilitatório sobre a liberação de acetilcolina.

Portanto, a dopamina exerce um duplo papel sobre a liberação de acetilcolina apresentando funções diferentes através de seus receptores D1 e D2. Enquanto o efeito mediado pelo receptor D2 parece ser direto, o mecanismo de regulação da facilitação da liberação de acetilcolina que é mediado pelo receptor D1 parece ser indireto, considerando que estudos de hibridização *in situ* indicam que a maioria dos receptores D1 não estão localizados nos interneurônios colinérgicos estriatais (Weiner *et al.*, 1991).

Vale salientar que pesquisas recentes sugerem que a dopamina controla a liberação de acetilcolina predominantemente através dos

receptores D1. De fato, a transmissão dopaminérgica parcialmente prejudicada afeta a liberação de acetilcolina suprimindo a influência facilitatória mediada pelo receptor D1 (Bertorelli *et al.*, 1992).

Contudo, Consolo *et al.*, (1992) demonstraram que o antagonista SCH 23390 quando aplicado localmente no corpo estriado alterou a liberação de acetilcolina. Este antagonista também bloqueou o aumento da liberação de acetilcolina induzido por *d*-anfetamina e cocaína. Estes resultados sugerem que os receptores D1 que regulam a liberação de acetilcolina podem estar localizados no corpo estriado.

3.1 - Drogas que atuam nos sistemas dopaminérgico ou colinérgico

O mazindol (5-hidroxi-5-p-clorofenil-2,3-dihidro-5H-imidazo-2,1-a-isoindol) é um derivado imidazoisoindol bastante utilizado como anorexígeno em humanos (Shimizu *et al.*, 1991). Embora não seja quimicamente relacionado às anfetaminas, apresenta semelhança farmacológica com estas drogas. O mecanismo causador da anorexia parece ser a inibição da recaptação de dopamina (Carlini *et al.*, 1995).

No Brasil há um alto consumo de drogas anorexígenas, tipo anfetamina, sendo o mazindol, uma das drogas mais usadas (Nappo, 1992). Além disso, uma pesquisa feita pelo CEBRID (Centro Brasileiro de Informação sobre Drogas Psicotrópicas) mostrou que entre os estudantes de primeiro e segundo graus de várias cidades do Brasil, os inalantes, benzodiazepínicos e drogas tipo anfetamina são as mais preferidas. (Carlini *et al.*, 1990).

A cocaína é um dos alcalóides presentes nas folhas provenientes de duas espécies do gênero *Erytroxylum*, vulgarmente denominado, coca: a *Erytroxylum novogranatense*, variedade trujillo, cultivada legalmente e cuja produção destina-se a indústria farmacêutica, onde a cocaína é utilizada como anestésico local ou a indústria alimentícia, como constituinte de chás e a *Erytroxylum coca*, que constitui a principal fonte de produção ilícita (Chasin & Salvadori, 1996).

A cocaína é um potente anestésico local (Ushijima *et al.*, 1995) e atua como poderoso agente simpatomimético com efeitos psicoestimulantes no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo considerado o mais potente psicoestimulante de ocorrência natural, razão pela qual é utilizada como fármaco de abuso (Chasin & Salvadori, 1996). Do ponto de vista de saúde pública esta droga é considerada uma das drogas de abuso mais importante e é responsável por consequências desastrosas, tais como deterioração de famílias e cidades e aumento da violência e do crime (Johanson & Schuster, 1995).

A cocaína bloqueia a recaptação de dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e norepinefrina (NE) no SNC. Entretanto, a determinação de qual destas ações está associada com seus efeitos causadores de dependência só recentemente está sendo elucidado (Johanson & Schuster, 1995). Há uma correlação positiva entre a potência da cocaína e alguns compostos relacionados como bloqueadores da recaptação de dopamina e sua habilidade em causar dependência em estudos de autoadministração em animais (Berger *et al.*, 1989; Ritz *et al.*, 1987). Entretanto, não foram encontradas ainda correlações significativas entre estes efeitos e a recaptação de NE e 5-HT. Estes dados claramente sugerem que é o bloqueio da recaptação de DA uma

etapa essencial para estes efeitos da cocaína (Johanson & Schuster, 1995).

O mecanismo de ação da cocaína consiste em inibir a recaptação de catecolaminas, principalmente dopamina, e também diminuir a permeabilidade das membranas de células nervosas ao sódio, daí seu efeito anestésico local. Os efeitos da cocaína sobre o metabolismo de dopamina explicam a euforia e dependência causados por esta droga. A cocaína inicialmente aumenta a liberação e inibe a recaptação de dopamina causando euforia. Com o uso regular as concentrações de dopamina no cérebro diminuem, eventualmente levando a uma supersensibilidade do receptor dopaminérgico. Esta mudança na sensibilidade dos receptores pós-sinápticos parece ser a base para as sensações que ocorrem na suspensão da droga (Johanson & Schuster, 1995).

A apomorfina é uma droga dopaminérgica direta não seletiva que age em receptores dopaminérgicos D1 e D2 (Amabeoku, 1994). Sua atividade farmacológica é bem conhecida. O animal tratado com apomorfina apresenta comportamento estereotipado e aumento da atividade locomotora (Hagiwara *et al.*, 1993).

A sulpirida é um neuroléptico atípico que apresenta atividade antipsicótica e anti-depressiva, sendo usado para o tratamento da esquizofrenia aguda e crônica (Long, 1996). A pimozida é um neuroléptico também atípico do grupo das difenilbutilpiperidinas, usado para o tratamento da esquizofrenia crônica e demais psicoses (Baldessarini, 1996). O mecanismo de ação da pimozida e sulpirida é o bloqueio seletivo dos receptores dopaminérgicos D2, embora a pimozida em doses altas afete o *turnover* de dopamina (Long, 1996).

Embora a sulpirida seja quase que exclusivamente antagonista dos receptores D2 (Hollister, 1992), também possui uma atividade anti-serotonérgica (Alter *et al.*, 1986). Em altas doses se liga com o receptor D2 no corpo estriado (Matsubara *et al.*, 1993), enquanto em baixas doses bloqueia preferencialmente receptores D2 pré-sinápticos, controlando assim a liberação de dopamina no corpo estriado (Sigala *et al.*, 1991). Dentro da família de D2-símile, a sulpirida apresenta maior potência em D2 e D4 do que em D3 (Seeman & Van Tol, 1994).

A atropina é um alcalóide derivado das folhas da planta *Atropa belladonna*. É uma droga antimuscarínica não seletiva, que se liga tanto a receptores M1 quanto à M2-símile. Produz principalmente efeitos excitatórios no SNC. Afeta o sistema extrapiramidal, reduzindo o movimento involuntário e a rigidez de pacientes com doença de Parkinson. Durante muitos anos foi usada no tratamento da doença de Parkinson e era a principal forma de tratamento antes do descobrimento da levodopa (Rang & Dale, 1993).

O carbacol ou carbamilcolina é uma droga colinérgica direta que de modo semelhante à acetilcolina, age em receptores nicotínicos e muscarínicos, mas não é facilmente hidrolisada. Nos receptores muscarínicos esta droga age seletivamente nos receptores M2-símile (Brown & Taylor, 1995).

OBJETIVOS

Considerando as evidências da relação existente entre a neurotransmissão dopaminérgica e colinérgica em corpo estriado foram utilizadas neste trabalho dois agonistas dopaminérgicos (mazindol e cocaína), que agem indiretamente inibindo a recaptação de dopamina neuronal, um agonista dopaminérgico não seletivo que age diretamente nos receptores D1 e D2 (apomorfina), dois antagonistas dopaminérgicos D2 (pimozida e sulpirida), um agonista muscarínico M2 (carbacol), um antagonista M1 e M2 não seletivo (atropina) e verificados seus efeitos em ambos os sistemas.

Do ponto de vista experimental, o presente trabalho é dividido em 7 protocolos experimentais:

PROTOCOLO I:

- Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos ou dopaminérgicos sobre o comportamento (campo aberto e catalepsia) de rato;

PROTOCOLO II:

- Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos em córtex motor de rato;

PROTOCOLO III:

- Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato;

PROTOCOLO IV:

- Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e sua associação com agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato;

PROTOCOLO V:

- Efeito da cocaína sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato;

PROTOCOLO VI:

- Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos ou dopaminérgicos sobre os níveis de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) em córtex motor e corpo estriado de rato;

PROTOCOLO VII:

- Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos ou dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor e corpo estriado de rato.

MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Animais

Foram utilizadas ratas Wistar, adultas-jovens, virgens, 2-4 meses, com peso variando entre 180 - 200 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclos de alternância claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

2 - Preparo das drogas

2.1 Mazindol, pimozida e sulpirida

Mazindol (Dasten 2 mg, cápsulas, Degussa S/A, SP, Brasil), pimozida (Orap 4 mg, comprimidos, Jansen Farmacêutica LTDA, SP, Brasil) e sulpirida (Equilid 200 mg, comprimidos, Merrel Lepetit, SP, Brasil) foram macerados e suspensos em água bidestilada, obtendo-se as seguintes concentrações finais:

Droga	Concentração final
Mazindol	1 mg/mL
Pimozida	2 mg/mL
Sulpirida	10 mg/mL

2.2 - Carbacol, atropina e apomorfina

Carbacol (cloreto de carbamilcolina, Sigma, USA), atropina (sulfato de atropina, Sigma, USA), apomorfina (cloridrato de apomorfina, Sigma, USA) e cocaína (cloridrato de cocaína, fornecido pela Polícia Federal, Fortaleza, Brasil) foram dissolvidos em água bidestilada, obtendo-se as seguintes concentrações finais:

Droga	Concentração final
Carbacol	0,5; 1 e 2 mg/mL
Atropina	0,5; 1 e 2 mg/mL
Apomorfina	1 mg/mL
Cocaína	5; 10 e 50 mg/mL

3 - Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com mazindol, pimozida, sulpirida, carbacol, atropina, cocaína ou apomorfina, diariamente durante 7 dias, utilizando-se uma cânula intragástrica de polietileno. Vinte e quatro horas após a última administração, os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e as áreas cerebrais de interesse dissecadas sobre gelo. Os animais controles foram tratados com água bidestilada.

O **Quadro 5** sumariza as drogas com suas respectivas doses e vias de administração.

Quadro 5 - Drogas utilizadas com respectivas doses e vias de administração

Droga	Dose	Via de administração	Abreviatura
mazindol	10 mg/kg	oral	maz 10
pimozida	10 mg/kg 20 mg/kg	oral	pim 10 pim 20
sulpirida	100 mg/kg	oral	sul 100
cocaína	5 mg/kg 10 mg/kg 50 mg/kg	intraperitoneal	coc 5 coc 10 coc 50
apomorfina	1 mg/kg	intraperitoneal	apo 1
carbacol	5 mg/kg 10 mg/kg 20 mg/kg	oral	cbc 5 cbc 10 cbc 20
atropina	5 mg/kg 10 mg/kg 20 mg/kg	oral	atr 5 atr 10 atr 20

Quando as drogas foram administradas em associação havia um intervalo de 30 minutos entre a primeira e a segunda droga. As associações utilizadas são sumarizadas no **Quadro 6**.

Quadro 6 - Drogas utilizadas em associação

Associação	Abreviatura
pimozida 10 + mazindol 10	pim 10 + maz 10
pimozida 20 + mazindol 10	pim 20 + maz 10
pimozida 10 + apomorfina 1	pim 10 + apo 1
pimozida 20 + apomorfina 1	pim 20 + apo 1
pimozida 20 + carbacol 5	pim 20 + cbc 5
sulpirida 100 + mazindol 10	sul 100 + maz 10
sulpirida 100 + apomorfina 1	sul 100 + apo 1
atropina 5 + mazindol 10	atr 5 + maz 10

4 - Material utilizado nos experimentos

- Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça);
- Banho Maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- Centrífuga (modelo J-21C, Beckman, CA, USA);
- Contador de cintilação líquida (modelo LS 100, Beckman, Fullerton, Ca, USA);
- Contador de cintilação líquida (modelo LS 6500, CA, USA);
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- Espectrofotômetro (Modelo Beckman DU, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (acoplado ao sistema de modernização Gilford, Oberlin, Ohio, USA);
- Espectrofotômetro (modelo DU 640B, Beckman , CA, USA);
- Equipamento de milipore para filtração à vácuo (Milipore apparatus, Bedford, MA, USA);
- Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil);
- Filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Maidstone, England);
- Frascos de vidro para contagem de cintilação (*vials* Beckman, Fullerton, Ca, USA);
- Homogeneizadores (Bellico, USA);
- Guilhotina (Harvard, USA);
- Micropipetas (H,E. Pedersen, Dinamarca);
- Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil).

5 - Dissecação das áreas cerebrais

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA), os encéfalos retirados rapidamente e colocados sobre papel alumínio numa placa de Petri com gelo.

Seguindo a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do corpo estriado. O corpo estriado (caudado, putamen e globo pálido) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Após a retirada do corpo estriado, o rebatimento do córtex feito inicialmente foi desfeito, ou seja, procurando-se reconstruir o contorno dos hemisférios cerebrais, o córtex foi recolocado em sua posição inicial e, com o auxílio de uma tesoura de microdissecação, foi removida em sua porção superior e mediana, numa extensão em torno de 3-5 mm, tendo como limite posterior um plano imaginário que dividia o cérebro em partes iguais, anterior e posterior. A porção cortical assim retirada corresponde a área motora do córtex fronto-parietal (Zilles & Wree, 1985).

Terminada a dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio devidamente identificado, pesada e conservada a -10 °C para uso posterior. Quando foi necessária a estocagem por um certo período

de tempo (no máximo uma semana) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (Burke & Greenbaun, 1987; Fielder *et al.*, 1987).

6 - Determinação da densidade de receptores muscarínicos

A densidade de receptores muscarínicos foi determinada, através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais, variando os seguintes parâmetros:

- Receptores M1 + M2-símile

Para determinação de receptores muscarínicos M1 + M2-símile foi utilizado o ligante não específico 3H-N-metilescopolamina (3H-NMS, 85 Ci/mmol - New England), de acordo com método previamente descrito (Dombrowski *et al.*, 1983).

- Receptores M1-símile

Para determinação de receptores muscarínicos M1-símile foi utilizado o ligante não específico 3H-N-metilescopolamina (3H-NMS, 85 Ci/mmol - New England), na presença de 200 μ M de carbacol, para bloquear sítios M2-símile, segundo uma adaptação de método previamente descrito (Joyce, 1991).

- Receptores M2-símile

Para determinação de receptores muscarínicos M2-símile foi utilizado o ligante não específico 3H-N-metiescopolamina (3H-NMS, 85 Ci/mmol - New England), na presença de 100 μ M de pirenzepina, para bloquear sítios M1-símile, segundo uma adaptação de método previamente descrito (Joyce, 1991).

6.1 - Método

O antagonista muscarínico marcado, 3H-N-metilescopolamina, liga-se a sítios específicos dentre os quatro primeiros segmentos transmembrana dos receptores muscarínicos (Wheatly *et al.*, 1988) que existem nos tecidos homogeneizados. Assim, o ligante tritiado marca os receptores presentes no tecido estudado.

A atropina é um outro antagonista clássico utilizado nos “brancos” dos experimentos para determinar a radioatividade de *background* ou ligações-não específicas. A atropina acrescentada em concentração muito maior do que a da 3H-NMS interage seletivamente com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga marcada, que é logo depois filtrada. A radioatividade contida no filtro é então determinada por cintilação líquida.

6.2 - Procedimento experimental

Terminada a dissecação das áreas cerebrais em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão fosfato de sódio, 150 mM, pH 7,4.

Os homogenatos contendo 150 - 180 µg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo 2,35 nM de 3H-NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 µM em um volume final de 0,2 mL, para experimentos de pontos únicos. Para experimentos de saturação o ligante foi utilizado em concentrações que variavam entre 0,0031 e 5,95 nM.

Após incubação a 37 °C por 30 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9% gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 48 %. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 µM os resultados foram expressos como fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry *et al.*, (1951) utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

6.3 - Soluções reagentes

- Coquetel de cintilação

0,5 g de *p*-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

- Solução estoque de atropina

Sulfato de atropina (Sigma, St. Louis, MO, USA) em água bidestilada, para obter uma concentração de 0,5 mM.

- **Solução estoque de 3H-N-metil-escopolamina (3H-NMS)**

Cloridrato de 3H-NMS (85 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 7,4 para obter uma solução de concentração 23,52 nM.

- **Tampão fosfato de sódio**

NaH₂PO₄ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma solução 150 mM e o pH foi ajustado para 7,4 com solução de HCl 1N (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

- **Carbacol**

Cloreto de carbamilcolina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em tampão fosfato de sódio (150 mM, pH 7,4), obtendo-se uma concentração final de 8000 µM.

- **Pirenzepina**

Gastrozepina (comprimidos de 50 mg, Boehringer & Cia, LTDA, São Paulo, Brasil) foram diluídos em tampão fosfato de sódio (150 mM, pH 7,4), obtendo-se uma concentração de 100 µM.

7- Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos

A densidade de receptores dopaminérgicos foi determinada, através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais, variando os seguintes parâmetros:

- Receptores D1-símile

Foi utilizado o ligante específico 3H-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol - New England Nuclear, USA), de acordo com o método previamente descrito (Meltzer *et al.*, 1989).

- Receptores D2-símile

Foi utilizado o ligante específico 3H-espiroperidol (114,0 Ci/mmol - New England Nuclear, USA), segundo uma adaptação de método previamente descrito por Kessler *et al.*, 1991 e Meltzer *et al.*, 1989.

7.1 - Método

O ligante 3H-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D2-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₂ (Kessler *et al.*, 1991; Terai *et al.*, 1989). Para bloquear os receptores serotoninérgicos foi utilizado um antagonista seletivo, a mianserina. O 3H-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D1-símile e não tem afinidade por receptores serotoninérgicos.

A dopamina foi utilizada nos “brancos” dos ensaios para determinar a radioatividade de *background* ou ligações-não específicas. A dopamina acrescentada em concentração muito maior do que 3H-SCH 23390 ou 3H-espiroperidol interage seletivamente com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga marcada, que é logo depois filtrada. A radioatividade contida no filtro é então contada por cintilação líquida.

7.2 - Procedimento experimental

Terminada a dissecação das áreas cerebrais em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % em tampão TRIS HCl 50 mM, pH 7,4.

Os homogenatos contendo 150-180 μg de proteína foram incubados em tampão TRIS HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores D1-símile o tampão continha 5,75 nM de 3H-SCH 23390 para experimentos de pontos únicos ou 0,06 a 8,8 nM para experimentos de saturação. No caso dos receptores D2-símile o tampão continha 10 μM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos e 17,3 nM de 3H-espiroperidol para experimentos de pontos únicos ou 0,43 a 21,6 nM para experimentos de saturação. Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 μM (durante 10 minutos), sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados cinco vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % (peso/volume) gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 48 %. O *binding* específico foi calculado como o *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 100 μM e os resultados foram expressos em femtomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína

foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

7.3 - Soluções reagentes

- Coquetel de cintilação

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA), em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

- **3H-espiroperidol** (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, USA)

5 µL de 3H-espiroperidol foram diluídos em tampão TRIS HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

- **3H- SCH 23390** (87 Ci/mmol, Amersham Life Science)

5 µl de 3H- SCH 23390 foram diluídos em tampão TRIS HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM.

- Tampão TRIS HCl

6 g de TRIS HCl (TRIZMA BASE, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para 7,4.

- TRIS HCl modificado

NaCl 120 mM; KCl 1mM; CaCl₂ 2mM; MgCl₂ 1mM, NaEDTA 1mM e Na ascorbato 1mM foram dissolvidos em tampão TRIS HCl, 50 mM, pH 7,4.

- Mianserina

Comprimidos de mianserina (Tolvon 30 mg, Organon, SP, Brasil) foram macerados e diluídos em tampão TRIS HCl obtendo-se uma concentração final de 100 μ M.

- Dopamina (Cloridrato de 3-Hidroxitiramina)

Dopamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) foi dissolvida em tampão TRIS HCl 50 mM, pH 7,4 contendo ácido ascórbico a 0,02 % de forma a se obter uma concentração final de 4000 μ M.

8 - Determinação dos níveis de nucleotídeos cíclicos

8.1 - Preparação dos homogenatos

O tecido (córtex motor ou corpo estriado) foi homogeneizado a 20 % (para o ensaio do AMPc) ou a 40 % (para o ensaio do GMPc) em tampão Tris EDTA, 4 mM, e aquecido em banho-maria (80 - 100°) durante 10 minutos. Posteriormente foi centrifugado (10.000 rpm), durante 10 minutos e o sobrenadante resultante foi usado para o ensaio do AMPc e GMPc.

8.2 - AMPc

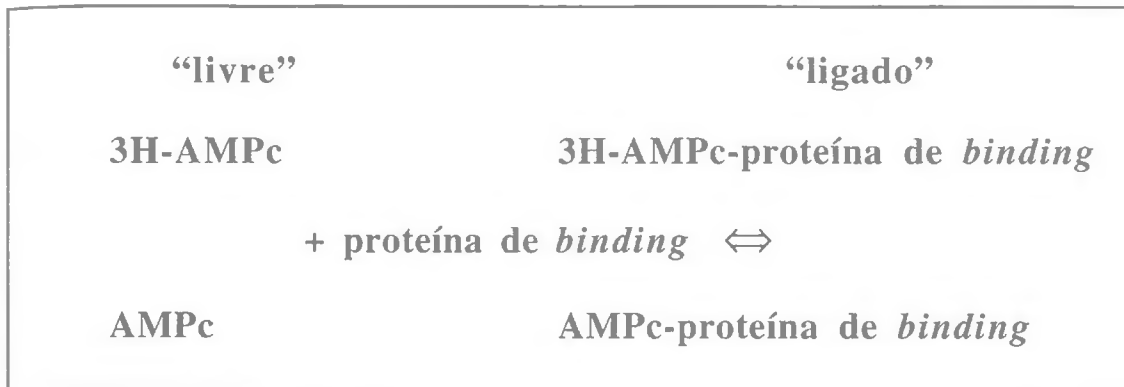
8.2.1 - Método

A concentração de AMPc foi medida através de radioimunoensaio usando um kit comercial para ensaio de AMPc (*Cyclic AMP assay system*, Amersham, USA).

O ensaio é baseado na competição entre o AMPc não marcado (“frio”) e uma quantidade fixa do composto marcado tritiado para se ligar a uma proteína de *binding* que tem uma alta afinidade e especificidade para o AMPc. A quantidade do complexo formado marcado, AMPc-proteína, é inversamente proporcional à quantidade de AMPc não marcado presente na amostra utilizada no ensaio. Os cálculos da quantidade de AMPc não marcado presente na amostra são feitos através da medida de radioatividade da proteína marcada.

A separação do AMPc ligado à proteína do nucleotídeo não marcado é feita por adsorção do nucleotídeo livre em carvão, seguido por centrifugação. Uma alíquota do sobrenadante é então removida para contagem da radioatividade por cintilação líquida. A concentração do AMPc não marcado é então determinada através de uma curva padrão linear. Um resumo esquemático do ensaio do AMPc é apresentado no **Quadro 7**.

Quadro 7 - Resumo esquemático do método de determinação dos níveis de AMPc



8.2.2 - Reagentes do kit comercial

- Tampão Tris EDTA;
- Proteína de *binding* purificada de músculo de bovino;
- 8-3H-AMPc: (8-3H) 3,5-fosfato cíclico de adenosina triciado, 180 pmol contendo 5 μ Ci);
- AMPc padrão: (3,5-fosfato de adenosina cíclico padrão, 1600 pmol);
- Adsorvente de carvão;
- Sulfato de amônia.

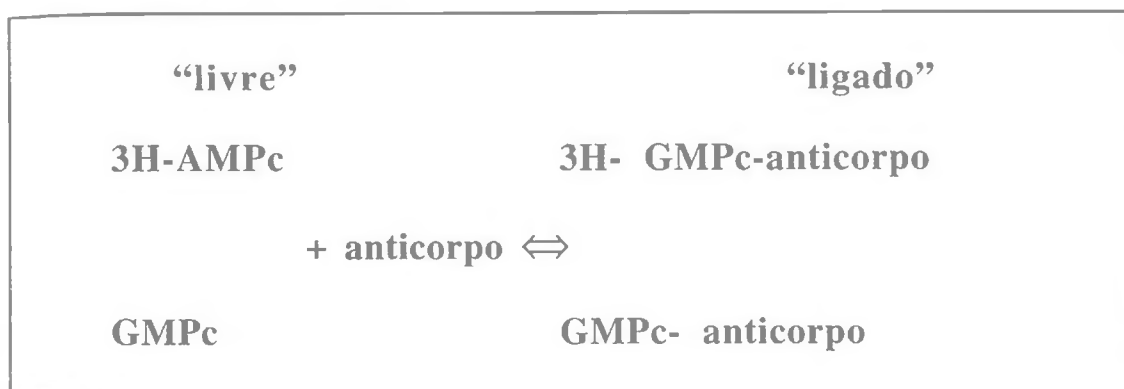
8.3 - GMPc

8.3.1 - Método

A concentração de GMPc foi medida através de radioimunoensaio usando um kit comercial para ensaio de GMPc (*Cyclic GMP assay system*, Amersham, USA).

O ensaio é baseado na competição entre o GMPc não marcado (“frio”) e uma quantidade fixa do composto marcado com trítio para se ligar a um antisoro que tem uma alta especificidade e afinidade para o GMPc. A quantidade de GMPc marcado ligado ao antisoro é inversamente proporcional à quantidade de GMPc presente na amostra do ensaio. A quantidade de GMPc não marcado presente na amostra é calculada pela medida da radioatividade de anticorpo ligado. A separação do complexo GMPc marcado-anticorpo do nucleotídeo não marcado é feita pela precipitação com sulfato de amônio seguido por centrifugação. O precipitado que contém o complexo ligado ao anticorpo, é dissolvido em água e sua atividade é determinada através da contagem da radioatividade por cintilação líquida. A concentração de GMPc não marcado na amostra é determinada através de uma curva padrão linear. Um resumo esquemático do ensaio do GMPc é apresentado no **Quadro 8**.

Quadro 8 - Resumo esquemático do método de determinação dos níveis de GMPc



8.3.2 - Reagentes do kit comercial

- Tampão Tris EDTA;
- Antisoro específico para GMPc;
- 8-3H-GMPc (8-3H) 3',5' - fosfato cíclico de guanosina triciado, 80 pmol contendo 1,6 μ Ci);
- GMPc padrão (3',5'-fosfato cíclico de guanosina);
- Reagente “branco”;
- Sulfato de amônia.

8.4 - Medida da radioatividade

Os discos de papel de filtro contendo o material a ser analisado são colocados em frascos apropriados (*vials*) contendo 1 mL (para o ensaio do AMPc) ou 6 mL (para o GMPc) de um coquetel de cintilação líquida miscível em água, READY FLOW III (AMBRIEX S/A). A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 48 %. Os resultados foram expressos em pmoles por miligrama de proteína. A concentração de

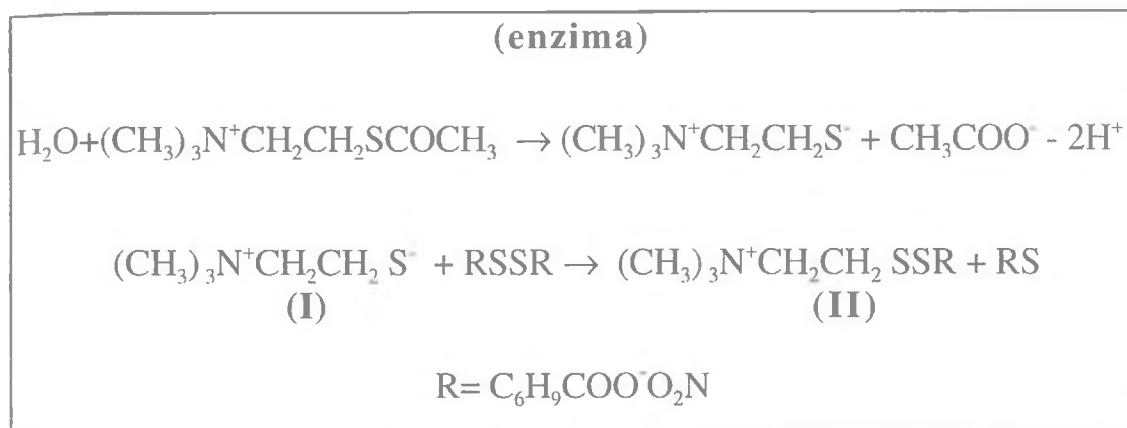
proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

9 - Determinação da atividade da acetilcolinesterase (AChE)

9.1 - Método

A atividade acetilcolinesterásica (AChE) foi determinada a 25 °C e pH 8,0 de acordo com o método de Ellman *et al.*, (1961) que tem como princípio a medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditio-bis-2 nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico (II). Um resumo esquemático do método é apresentado no **Quadro 9**.

Quadro 9 - Resumo esquemático do método de determinação da atividade acetilcolinesterásica



A atividade enzimática foi medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos (Alles & Hawes, 1953). As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 412 nm através de um espectrofotômetro (Beckman DU acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA ou Beckman, modelo DU 640B, CA, USA) que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade (leitura em décimos de milésimos de absorbância). A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto.

9.2 - Soluções reagentes

- Solução de ácido 5:5'-ditio- bis-2 nitrobenzoato, DTNB (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 mM em tampão fosfato de sódio;

- Solução de iodeto de acetiltiocolina, ATC (Sigma, St. Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada;
- Tampão Fosfato de sódio: $\text{NaH}_2\text{OPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 0,1 mM em água bidestilada, pH 7,0.

10.0 - Dosagem de proteína

10.1 - Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25 °C utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry *et al.*, 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio. Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptófano livres ou ligados a proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração foi medida em 750 nm, através de espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA.

10.2 - Soluções reagentes

- Reagente A: Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2 % em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N;
- Reagente B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 % em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1 %;
- Reagente C: Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1 mL do reagente B, misturados no momento de usar);
- Reagente de Folin - Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil), 1:1 em água bidestilada;
- Solução de albumina sérica bovina (Sigma, St Louis, MO, USA) 1 mg/mL em água bidestilada.

11 - Testes comportamentais

11.1 - Teste de catalepsia

Nesse teste as extremidades superiores do animal foram colocadas em uma base rígida com 2 cm de espessura e 9 cm de altura. Os animais foram habituados durante 1 min e posteriormente medido o tempo em que eles permaneciam imóveis (na mesma posição) sobre a barra. O tempo máximo de permanência era de 150 s. O estado cataléptico foi considerado positivo quando o animal ultrapassava o tempo de 60 s nessa posição (Ahlenius & Hillegaard, 1986 & Jorgensen *et al.*, 1994). O teste de catalepsia foi realizado 1 h após o tratamento com as drogas estudadas.

11.2 - Teste de campo aberto

Os animais foram colocados em um campo aberto com área de 50 x 50 cm e iluminado por uma luz vermelha. Este campo foi confeccionado com cartolina de cor vermelha, a qual foi dividida em quatro quadrantes. Os animais foram primeiro habituados durante 1 minuto ao campo aberto e posteriormente submetidos ao teste que era feito numa sala livre de sons. O observador colocava os animais nesse campo e registrava o nº de travessias de um quadrante para outro durante 3 minutos. O tempo de observação foi realizado 1 h após o tratamento (Jorgensen *et al.*, 1994).

12 - Análise estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador Macintosh Quadra 605 (programa *Statview*). Para comparação de médias de dois grupos foi utilizado o teste t de Student. Para comparações múltiplas foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) e teste de Fisher como um teste *post hoc* para as diferenças. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

PROTOCOLO I

**Efeito de agonistas e antagonistas
muscarínicos ou dopaminérgicos
sobre o comportamento
(campo aberto e catalepsia)
de rato**

INTRODUÇÃO

A administração crônica de estimulantes psicomotores que atuam como agonistas dopaminérgicos indiretos resulta em numerosas alterações comportamentais, incluindo uma sensibilidade aumentada, ou sensibilização comportamental (Kalivas & Stewart, 1991; Robinson & Becker, 1986).

A sensibilização comportamental em animais se assemelha à psicose induzida por psicoestimulantes em humanos e tem merecido especial atenção como um modelo animal de esquizofrenia (Post & Contel, 1983; Robinson & Becker, 1986). Embora, seja conhecido que a sensibilização comportamental induzida por psicoestimulantes esteja relacionada com o aumento da disponibilidade de dopamina, várias pesquisas sugerem que os receptores dopaminérgicos D1-símile podem desempenhar um papel crítico nesta sensibilização (Hamamaura *et al.*, 1991; Stewart & Vezina, 1989; Ujike *et al.*, 1989; Vezina & Stewart, 1989).

Os neurônios do núcleo *accumbens* apresentam respostas inibitórias aumentadas tanto a dopamina como ao agonista seletivo do receptor D1, SKF 38393 após o tratamento diário com metanfetamina (Higashi *et al.*, 1989) ou cocaína (Henry *et al.*, 1989; Henry & White, 1991). Foi recentemente mostrado que a administração repetida de cocaína pode aumentar a atividade da adenilil ciclase e a atividade da proteína quinase AMPc-dependente, ambas as quais podem ser reguladas pelos receptores D1 (Terwilliger *et al.*, 1991).

Como os agonistas dopaminérgicos indiretos causam estimulação não seletiva de todos os receptores dopaminérgicos, o papel da estimulação crônica seletiva do subtipo de receptor D1 é difícil de ser estudado. A literatura mostra vários trabalhos considerando os efeitos do tratamento crônico com agonistas seletivos do receptor D1 sobre o comportamento dopamina-dependente. Braun & Chase (1988) primeiramente demonstraram que o tratamento com o agonista SKF 38393 aumentou a capacidade do agonista não seletivo D1/D2, apomorfina, em promover comportamento estereotipado, mas não alterou os efeitos comportamentais induzidos pelo agonista D2, quinpirole.

Existem evidências de que os receptores D1 e D2 podem interagir de um modo sinérgico ou antagônico. Agonistas do receptor D1 e D2 não são efetivos isoladamente, mas agem sinergisticamente estimulando a locomoção e induzindo a estereotipia (Arnt *et al.*, 1987); a locomoção depende da ativação do receptor D1 (Starr & Starr, 1989) e os comportamentos estereotipados orais, tais como “lamber” e “morder”, dependem da ativação dos receptores D2 (Arnt *et al.*, 1987; Ushijima *et al.*, 1988a; Ushijima *et al.*, 1988b).

Estudos neurofarmacológicos, neuroquímicos e neuroanatômicos demonstram uma interação dinâmica entre um número de diferentes neurotransmissores no sistema nervoso central. Estereotipia, catalepsia e atividade motora no campo aberto são comportamentos claramente dependentes da transmissão dopaminérgica nos sistemas nigroestriatal e mesolímbico do cérebro de mamíferos (Bernardi & Palermo-Neto, 1979; Bernardi *et al.*, 1981; Frussa-Filho *et al.*, 1992). Estes modelos podem ser usados para se estudar estas interações incluindo a interação dopamina-acetilcolina.

OBJETIVOS

Estudar o efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos sozinhos ou associados, sobre o comportamento (campo aberto e catalepsia) de ratos.

RESULTADOS

A **Figura 1** mostra os resultados do teste do campo aberto para a atividade locomotora horizontal. O mazindol 10 mg/kg, v.o., aumentou significativamente o número de travessias ($19,0 \pm 1,9$) quando comparado ao controle ($10,2 \pm 0,91$). Os animais tratados com pimozida 20 mg/kg, v.o., não apresentaram atividade no campo aberto ($0,0 \pm 0,00$). A pimozida quando administrada 30 minutos antes do mazindol, bloqueou o aumento observado na atividade locomotora com o mazindol ($6,9 \pm 0,74$). A apomorfina não alterou a atividade locomotora ($10,8 \pm 1,46$), mas quando associada à pimozida aumentou esta atividade em relação à pimozida sozinha ($6,2 \pm 1,25$). A sulpirida sozinha diminuiu a atividade locomotora ($1,4 \pm 0,87$) e quando associada ao mazindol bloqueou o aumento ocorrido com esta droga sozinha ($6,0 \pm 1,67$). Entretanto, na associação de sulpirida + apomorfina, os valores da atividade não diferiram daqueles do grupo controle ($8,5 \pm 1,91$).

A **Figura 2** mostra que a atropina e o carbacol não alteraram a atividade locomotora dos animais ($11,6 \pm 0,82$ e $8,6 \pm 0,88$). Entretanto quando a atropina foi associada com o mazindol houve um aumento de 112 e 87% na atividade locomotora ($21,7 \pm 4,30$), quando comparado ao controle e a atropina, respectivamente. A pimozida, quando associada ao carbacol, diminuiu a atividade locomotora dos animais quando comparada ao carbacol sozinho ($2,5 \pm 1,28$).

Na **Figura 3** são apresentados os efeitos da cocaína em diferentes doses sobre a atividade locomotora. Foi observado que a cocaína nas doses mais baixas (5 e 10 mg/kg) não promoveu alterações significativas na atividade locomotora ($10,5 \pm 1,15$ e $10,9 \pm 1,03$, respectivamente)

quando comparada ao controle ($10,2 \pm 0,91$). Entretanto, nas doses de 20 e 50 mg/kg, promoveu aumentos em torno de 200% na atividade locomotora ($20,5 \pm 3,12$ e $21,9 \pm 4,11$, respectivamente).

A **Figura 4** mostra os resultados do teste de catalepsia. A pimozida induziu um estado cataléptico, pois o animal permaneceu imóvel na barra durante $124 \pm 9,11$ segundos. A catalepsia observada com a pimozida sozinha não foi detectada quando esta droga foi associada ao mazindol ($5,6 \pm 0,79$ s). Apomorfina sozinha ou associada com a pimozida não causou efeito cataléptico ($39,6 \pm 8,49$ e $9,2 \pm 1,07$ s, respectivamente). Do mesmo modo, a sulpirida sozinha ou associada com mazindol ou apomorfina não induziu estado cataléptico ($45,0 \pm 9,70$; $43,3 \pm 16,41$ e $17,8 \pm 6,02$ s).

A atropina sozinha ($3,1 \pm 0,43$ s) ou associada ao mazindol ($1,8 \pm 0,31$ s) e o carbacol sozinho ($4,3 \pm 1,04$), ou associado à pimozida ($51,0 \pm 20,67$ s), não causaram efeito cataléptico (**Figura 5**).

Nº de travessias / 3 min

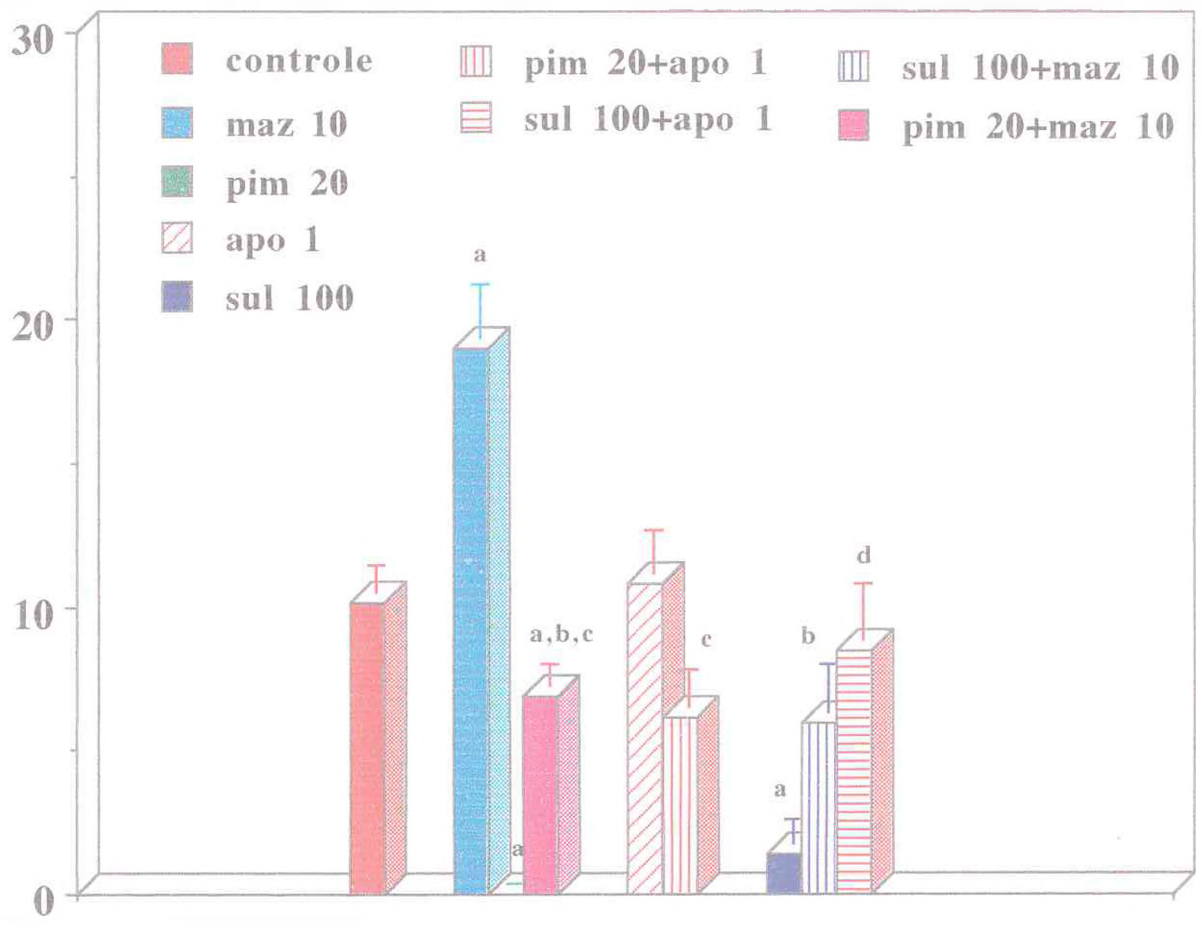


Figura 1 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a atividade locomotora no campo aberto. A atividade locomotora no campo aberto foi medida como o nº de travessias de um quadrante para outro. Ratos Wistar (180 - 200 g; 8 -10 animais por grupo) foram tratados com as drogas 1 h antes de serem submetidos ao teste. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. **a, b, c, d** = $p < 0.05$ quando comparados ao controle, mazindol, pimozida e sulpirida, respectivamente.

Nº de travessias / 3 min

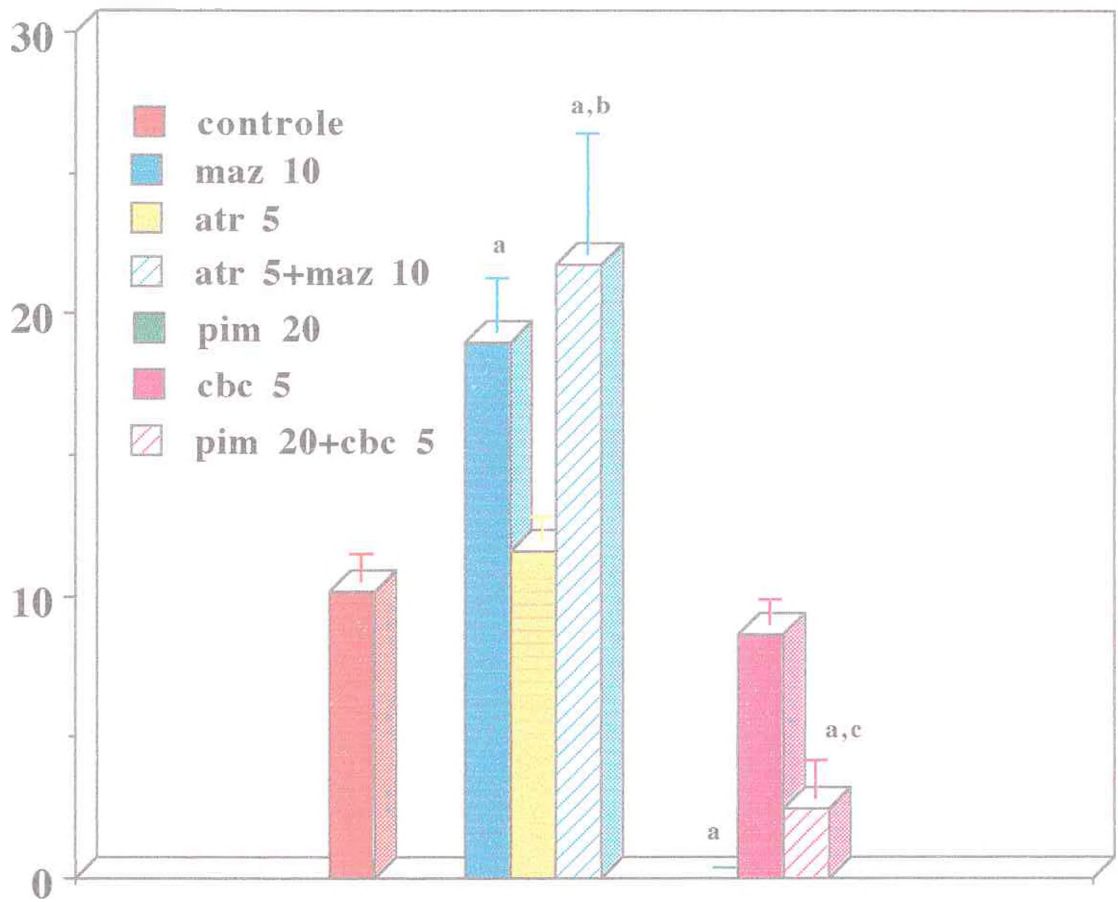


Figura 2 - Efeito de agonista e antagonista muscarínico sobre a atividade locomotora no campo aberto. A atividade locomotora no campo aberto foi medida como o nº de travessias de um quadrante para outro. Ratos Wistar (180 - 200 g; 8 -10 animais por grupo) foram tratados com maz 10; atr 5; pim 20; cbc 5 sozinhos ou associados (atr 5 + maz 10 e pim 20 + cbc 5) 1 h antes de serem submetidos ao teste. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. a, b, c = $p < 0,05$ quando comparados ao controle, atropina e carbacol, respectivamente.

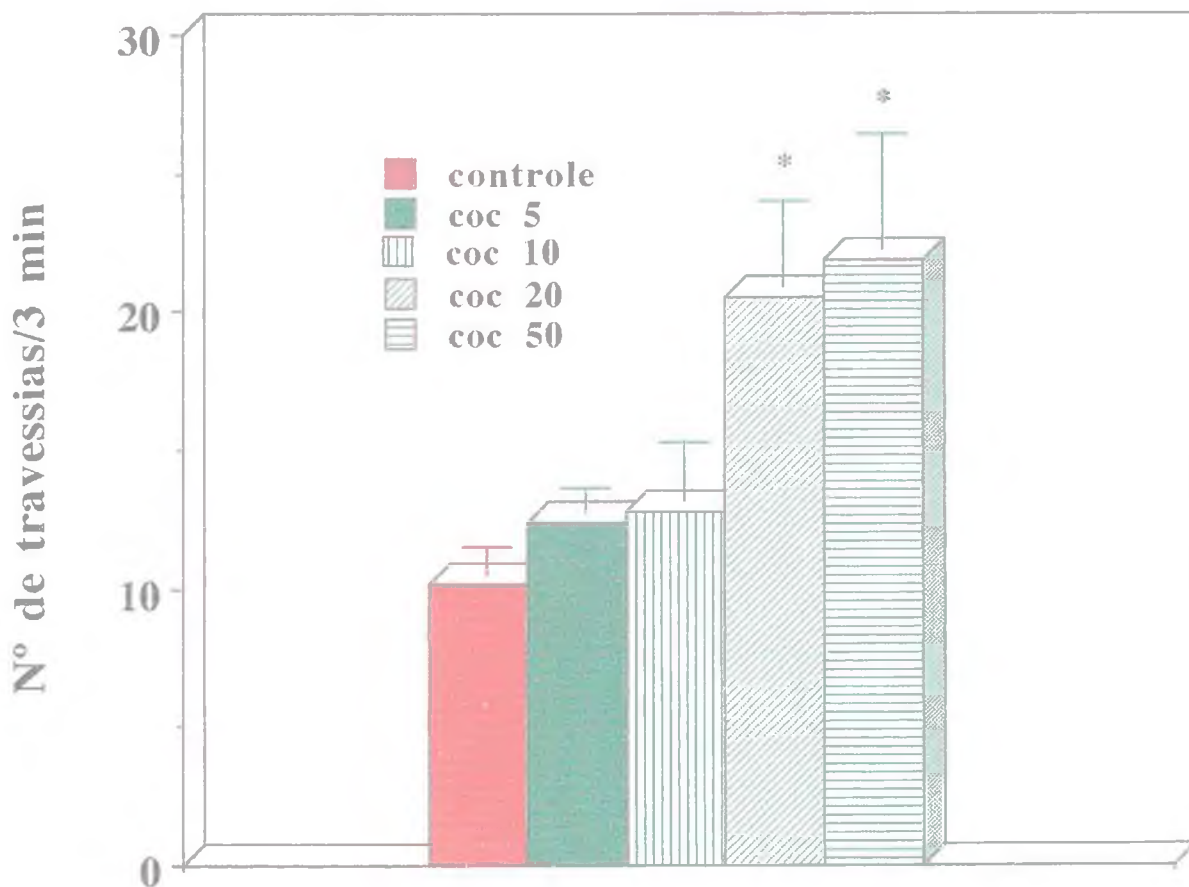


Figura 3 - Efeito da cocaína sobre a atividade locomotora (campo aberto). A atividade locomotora no campo aberto foi medida como o nº de travessias de um quadrante para outro. Ratos Wistar (180 - 200 g; 8 -10 animais por grupo) foram tratados com coc 5, 10, 20 e 50 mg/kg, i.p., 1 h antes de serem submetidos ao teste. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

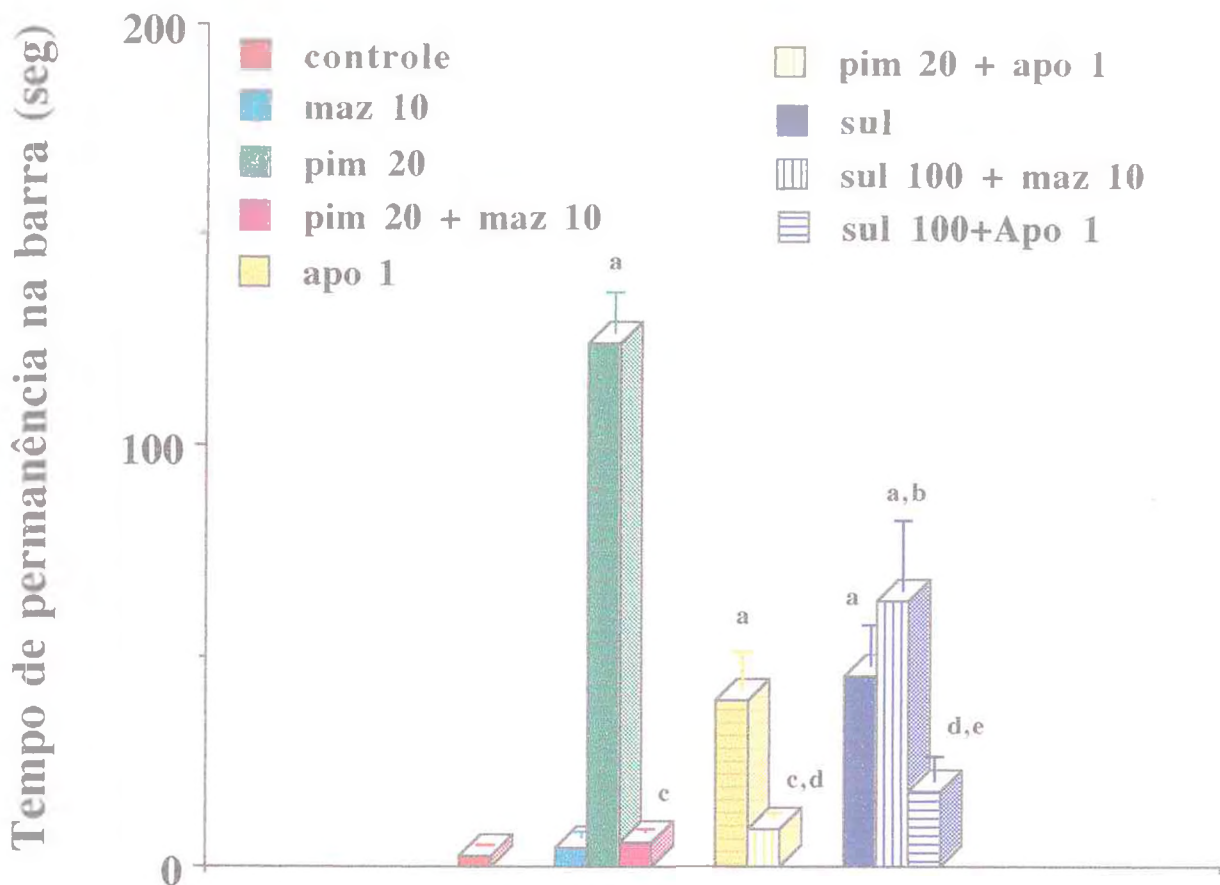


Figura 4 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos no teste de catalepsia. A catalepsia foi medida como o tempo de imobilidade que o animal permanecia na barra. Ratos Wistar (180 - 200 g; 8 -10 animais por grupo) foram tratados com maz 10; pim 20; apo 1; sul 100, sozinhos ou associados (pim 20 + maz 10; pim 20 + apo 1; sul 100 + maz 10 e sul 100 + apo 1) 1 h antes de serem submetidos ao teste. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. **a, b, c, d, e** = $p < 0,05$ quando comparados ao controle, mazindol, pimozida, apomorfina e sulpirida, respectivamente.

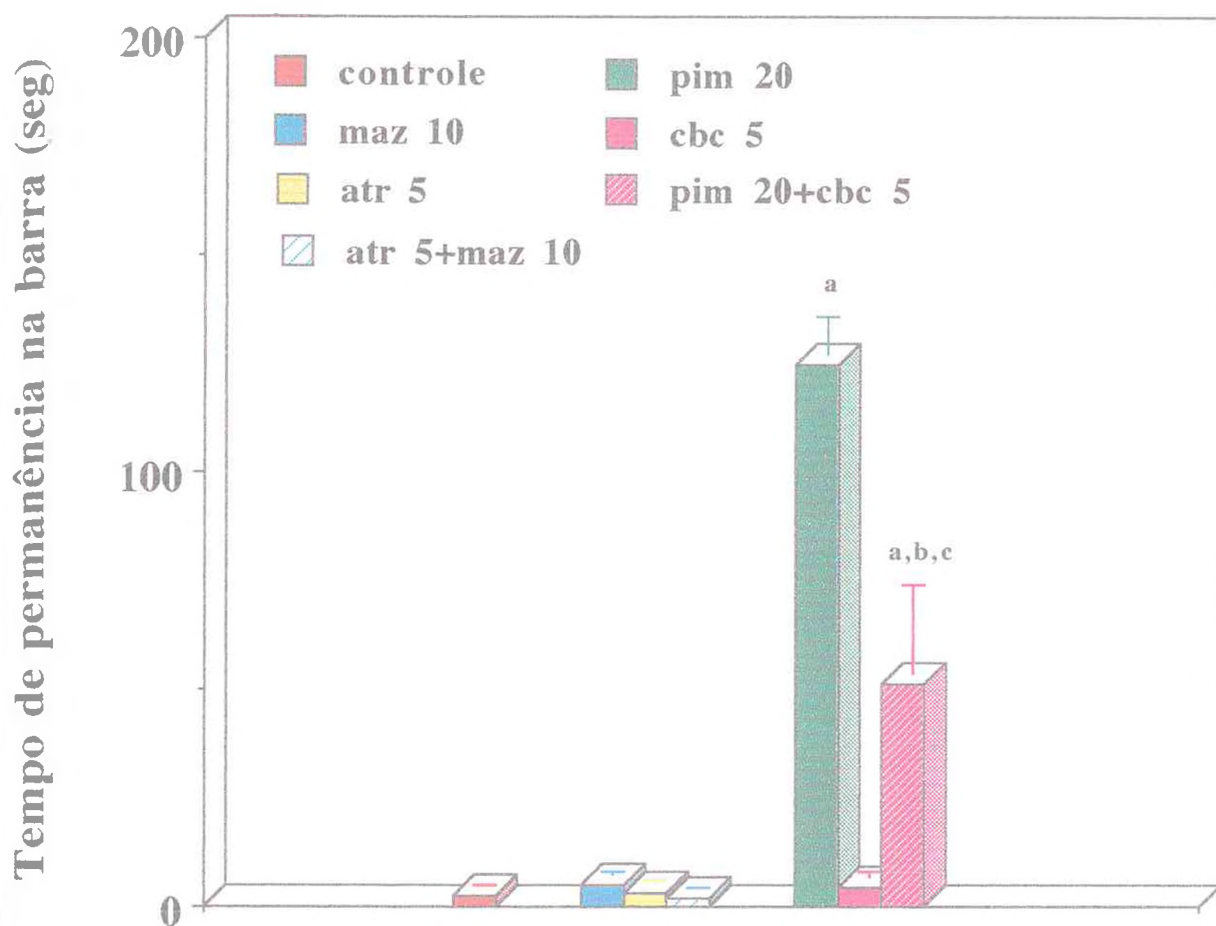


Figura 5 - Efeito de agonista e antagonista muscarínico e dopaminérgico sobre o teste de catalepsia. A catalepsia foi medida como o tempo de imobilidade que o animal permanecia na barra. Ratos Wistar (180 - 200 g; 8 -10 animais por grupo) foram tratados com maz 10; pim 20; cbc 5 e atr 5 sozinhos ou associados (pim 20 + cbc 5; atr 5 + maz 10) 1 h antes de serem submetidos ao teste. Para análise estatística foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. a, b, c, d = $p < 0,05$ quando comparados ao controle, pimozida e carbacol, respectivamente.

DISCUSSÃO

A administração de mazindol e cocaína resultou numa sensibilização comportamental evidenciada pelo aumento da atividade locomotora. Esta sensibilização aumentada parece ser semelhante àquela induzida por outros psicoestimulantes (Robinson & Becker, 1986). Assim, a generalização desses efeitos que ocorrem entre estimulantes sugere um mecanismo comum para esta sensibilização comportamental (Aizenstein *et al.*, 1990; Baldo & Kelly, 1991).

Embora a sensibilização à cocaína e estimulantes relacionados tenha sido anteriormente demonstrada, a base neural para tal efeito não foi ainda definitivamente esclarecida (Robinson & Becker, 1986). As evidências sugerem um papel importante da dopamina no efeito estimulante locomotor da cocaína (Kalivas *et al.*, 1988; Kelly & Iversen, 1975; Kuczenski & Leith, 1981). Como o efeito anorexígeno do mazindol é primariamente, embora não exclusivamente, devido a inibição da recaptação de dopamina (Javitch *et al.*, 1984; Pogun *et al.*, 1991), é provável que a sensibilização locomotora induzida por esta droga também seja devido a ação da dopamina nos terminais dopaminérgicos. Existem evidências também (Baker *et al.*, 1993) mostrando que os efeitos comportamentais da cocaína são reproduzidos por compostos que agem primariamente bloqueando a recaptação de dopamina e que a ordem de potência é mazindol > nomifensina > GBR 12909.

A literatura mostra que o tratamento crônico com doses fixas de cocaína aumenta em magnitude a atividade locomotora e os movimentos estereotipados, e este fenômeno conhecido como sensibilização, parece ser mediado pelo sistema dopaminérgico (Johanson & Schuster, 1995).

Embora as evidências não sejam completamente consistentes, dados dos primeiros trabalhos nesta área sugerem que as vias dopaminérgicas mesolímbica e mesocortical estão envolvidas na dependência causada pela cocaína (Costall & Naylor, 1977). Algumas mudanças tais como alterações no transporte sináptico de dopamina, liberação de dopamina e/ou receptores dopaminérgicos poderiam contribuir para a sensibilização comportamental mediada pelo sistema dopaminérgico (Peris & Zahniser, 1989).

Foi demonstrado anteriormente que ratos submetidos a injeções diárias de cocaína, e após um período de 30 dias de suspensão da droga apresentaram hiperatividade (Zeigler *et al.*, 1991). Ushijima *et al.*, (1995) mostrou que a cocaína (5 a 10 mg/kg, i.p.) aumentou a atividade locomotora e o comportamento estereotipado em ratos de uma maneira dose-dependente. O pré-tratamento com SCH 23390, um antagonista do receptor D1-símile e raclopride, um antagonista do receptor D2-símile, significativamente reduziu os efeitos da cocaína sobre a atividade locomotora sugerindo que estes efeitos estimulatórios envolvem a ativação de ambos os receptores D1 e D2-símile.

Gogerty *et al.*, (1975) relataram que os efeitos estimulantes do mazindol eram 3 a 4 vezes menos intensos do que aqueles produzidos pela *d*-anfetamina. Zambotti *et al.*, 1976 demonstraram que a metanfetamina 5 mg/kg aumentava a atividade motora. Posteriormente, Mattei & Carlini (1995) também observaram que a metanfetamina numa dose menor (2,5 mg/kg) também aumentava a atividade motora semelhante ao mazindol e que o mazindol era 4 vezes menos potente do que a metanfetamina nos seus efeitos sobre a atividade motora e movimentos estereotipados. Estes efeitos produzidos por ambas as drogas podem ser descritos como causados por um mecanismo similar,

ou seja, uma aumentada liberação de catecolaminas e uma inibição de sua captação pelos terminais nervosos (Seiden *et al.*, 1993; Heikkila *et al.*, 1981; Ross, 1979).

O tratamento com a cocaína aumentou o *binding* de 3H-espiroperidol (Protocolo V), enquanto que o tratamento com mazindol aumentou o *binding* de 3H-espiroperidol e 3H-SCH 23390 (PROTOCOLO III). Os resultados sugerem que os efeitos estimulatórios do mazindol sobre a atividade locomotora podem ser mediados via ativação dos receptores D2-símile, porque na presença dos antagonistas D2-símile, pimozida e sulpirida, o aumento na atividade locomotora observado com o mazindol foi significativamente atenuado, sugerindo que a ativação deste receptor é necessária para a ocorrência desta resposta comportamental.

No presente trabalho a apomorfina, 1 mg/kg, i.p., não apresentou efeito sobre a atividade motora. De fato, Fray *et al.*, (1980) demonstraram que a apomorfina causou aumentos dose-dependente da atividade locomotora, e de movimentos estereotipados, tais como “cheirar” e “lamber”, somente com doses acima de 5 mg/kg, s.c., e que nesta dose não houve aumentos significativos no “empinar-se”. É importante ressaltar que estes diferentes parâmetros comportamentais apresentam diferentes limiares de doses, e também são influenciados por fatores temporais. Por exemplo a locomoção foi aumentada durante 10 minutos com *d*-anfetamina 1 mg/kg e o “empinar-se” foi aumentado somente com doses de 3 e 5 mg/kg mas durante todo o período do teste. Com a apomorfina aumentos no “cheirar” foram encontrados com 0,25 mg/kg, aumentos no “lamber” com 0,5 mg/kg e aumentos no “morder” com 1 mg/kg. Assim, o efeito observado com a apomorfina é dependente da dose utilizada e do tempo de observação bem como das

condições experimentais (espécie de animal utilizado, protocolo experimental, etc). Shannon *et al.*, (1990), entretanto observou que a apomorfina nas doses de 3 e 10 mg/kg, aumentava a atividade locomotora.

Os neurolépticos apresentam respostas bioquímicas e comportamentais, algumas das quais se relacionam com sua potência como agentes antidopaminérgicos e antipsicóticos (Seeman, 1981; Seeman, 1985; Creese, 1983). Um comportamento comum induzido pelos neurolépticos é a catalepsia, que pode ser descrita como uma relativa imobilidade dos animais quando colocados em posições anormais (Munkvad *et al.*, 1968; Zetler, 1968). A capacidade de vários neurolépticos de provocar catalepsia está correlacionada com a potência destas drogas em melhorar os sintomas de doenças neuropsiquiátricas, e por sua vez a ação antipsicótica das mesmas está correlacionada ao bloqueio de receptores D2 produzido pelos neurolépticos (Creese *et al.*, 1976; Ezrin-Waters *et al.*, 1976; Owen *et al.*, 1978; Seeman *et al.*, 1981).

A catalepsia é um distúrbio motor, comumente associado com a inibição da neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado, enquanto a supressão da atividade locomotora espontânea, é pelo menos em parte, devido à transmissão dopaminérgica no sistema límbico (Ahlenius & Hillegaart, 1986). No teste de campo aberto foi observado que os animais tratados com pimozida 20 mg/kg não se locomoveram, permanecendo imóveis, o que foi confirmado no teste de catalepsia, quando os animais permaneceram na barra por mais de 120 s.

Interessantemente a pimozida bloqueou os efeitos do mazindol sobre a atividade motora, sugerindo provavelmente envolvimento dos

receptores D2 nesta atividade. Da mesma forma na associação de pimozida + mazindol, não ocorreu o estado cataléptico provocado pela pimozida, mostrando que o mazindol antagonizou o efeito da pimozida.

Os neurolépticos induzem catalepsia como um resultado do bloqueio dos receptores D2 centrais. A diminuição do estado cataléptico da pimozida quando associada com mazindol e apomorfina indica que houve aumento dos mecanismos dopaminérgicos centrais. Já o fato da sulpirida, apesar de ser um neuroléptico, não ter causado catalepsia nos animais, embora tenha bloqueado o efeito do mazindol sobre a atividade locomotora sugere que a ausência de efeito cataléptico da sulpirida seja devido à sua ação predominante à nível de sistema límbico.

Ambos, apomorfina e carbacol inibiram a catalepsia induzida pela pimozida. Estas observações sugerem que a ação cataleptogênica é mediada por um mecanismo dopaminérgico, provavelmente envolvendo os receptores D2, mas que é altamente susceptível a interações com o sistema colinérgico. Undie *et al.*, 1988 mostrou que a pilocarpina potencializou o estado cataléptico induzido por SCH 23390, mas que a mecamilamina, um agonista nicotínico não alterou tal efeito, indicando uma influência muscarínica, mas não nicotínica. Vale salientar que no presente trabalho (PROTOCOLO III) a pimozida (100 μ M) não pareceu interagir com receptores muscarínicos.

Anteriormente já foi demonstrado que anticolinérgicos como a escopolamina, em doses altas, produziu hiperatividade em camundongos (Bushnell, 1987), mas o exato mecanismo ainda não foi bem esclarecido. No presente trabalho o mazindol aumentou a atividade locomotora e este efeito foi potenciado pela atropina que sozinha não teve nenhum efeito. O efeito do mazindol sobre a atividade locomotora pode estar envolvido

com a inibição da recaptação de dopamina. Entretanto pode haver alguma influência do sistema colinérgico neste parâmetro examinado.

O mazindol na concentração de 100 μ M competiu pelo *binding* de 3H-NMS (PROTOCOLO III), enquanto que também foi demonstrado que a atropina competiu pelo *binding* de 3H-espiroperidol e 3H-SCH 23390 (PROTOCOLO IV). Atuando nos receptores pós-sinápticos, agonistas D2 diminuem a estimulação de interneurônios colinérgicos no corpo estriado e diminuem a liberação de acetilcolina (Scatton *et al.*, 1982a,b). Atuando nos receptores D2 pré-sinápticos, os agonistas D2 diminuem a liberação de dopamina (Brown *et al.*, 1985), portanto, removendo a inibição dopaminérgica da estimulação dos neurônios colinérgicos levando a um aumento da liberação de acetilcolina.

Várias evidências sugerem que anticolinérgicos podem produzir hiperatividade através de interações diretas ou indiretas com o sistema dopaminérgico. A alfametil tirosina inibiu a hiperatividade produzida por anticolinérgicos tais como escopolamina, benztropina e atropina (Thornburg & Moore, 1973). Similarmente, o comportamento rotatório produzido por escopolamina em ratos com lesão unilateral provocada por 6-hidroxi-dopamina, foi abolido por alfametil tirosina (Pycock *et al.*, 1978).

A atropina pode ter potenciado o efeito do mazindol, bloqueando os receptores pós-sinápticos da acetilcolina ou o mazindol, inibindo a recaptação de dopamina deixou mais dopamina livre para interagir com D2-pós sináptico, ocorrendo uma diminuição da transmissão colinérgica, levando a um aumento da atividade motora. Além do mais o bloqueio dos receptores muscarínicos pode ter produzido uma interação entre os

sistemas dopaminérgico e colinérgico, resultando num aumento da atividade locomotora.

Na verdade, o comportamento é uma atividade de organismos vivos e não um transmissor passivo de efeitos de drogas. Assim os efeitos das drogas sobre o comportamento dos animais neste trabalho estudadas, sofrem influência de características peculiares de cada droga, de sua interação com seus receptores específicos e sistemas efetores, de sua interação com vários sistemas, bem como do comportamento do animal anterior à administração da droga.

CONCLUSÕES

- É possível que a potencialização do efeito do mazindol pela atropina seja uma consequência do bloqueio dos receptores colinérgicos pós-sinápticos.

- O bloqueio dos receptores muscarínicos pode ter produzido uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico, resultando num aumento da atividade locomotora.

- O carbacol inibiu a catalepsia induzida pela pimozida. Estas observações sugerem que a ação cataleptogênica é mediada por um mecanismo dopaminérgico, provavelmente envolvendo os receptores D2, mas que é altamente susceptível a interações com o sistema colinérgico.

PROTOCOLO II

**Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os
receptores muscarínicos em córtex motor de rato**

INTRODUÇÃO

Os estudos da interação entre dopamina e acetilcolina são focalizados principalmente no corpo estriado (Lehmann & Langer, 1983; Stoof *et al.*, 1992) devido a sua relevância clínica na doença de Parkinson e efeitos colaterais extrapiramidais induzidos por neurolépticos. Entretanto, essa interação pode ocorrer em outras áreas cerebrais.

Alguns estudos mostram que agonistas dopaminérgicos aumentam a liberação de acetilcolina no córtex (Day & Fibiger, 1993). A acetilcolina é liberada no córtex primariamente de uma projeção dos *nucleus basalis*. Este sistema colinérgico do cérebro anterior basal exerce um importante papel na ativação cortical (Buzsaki & Gage, 1989; Semba, 1992). A regulação neuronal do sistema colinérgico é, portanto, de considerável interesse.

Estudos prévios mostram que a *d*-anfetamina, um estimulante psicomotor que aumenta as concentrações sinápticas de dopamina, bem como de noradrenalina e serotonina aumenta também o *turnover* e liberação de acetilcolina no córtex cerebral (Casamenti *et al.*, 1986; Casamenti *et al.*, 1987). Através da técnica de microdiálise foi observado que a apomorfina, um agonista dopaminérgico não seletivo também aumenta a liberação cortical de acetilcolina (Day & Fibiger 1993).

O aumento da liberação de acetilcolina induzido por anfetamina em córtex cerebral foi parcialmente bloqueado por antagonistas dopaminérgicos D1 e D2 seletivos, sugerindo que, pelo menos em

parte, os efeitos destas drogas sobre a liberação de acetilcolina cortical é mediada dopaminergicamente (Day & Fibiger, 1993) e que os receptores D1 e D2 têm um importante papel na ação da dopamina sobre a liberação de acetilcolina no córtex.

OBJETIVOS

No presente estudo, os efeitos do mazindol, um agonista dopaminérgico indireto que age inibindo recaptção de dopamina foram comparados com o efeito de um agonista direto, não seletivo, como a apomorfina. O objetivo principal deste estudo foi determinar os efeitos do mazindol, apomorfina e pimozida sozinhas ou associadas sobre os receptores muscarínicos (M1 + M2-símile, M1 e M2-símile) em córtex motor de ratos e verificar se estes efeitos eram bloqueados pela pimozida, um antagonista dopaminérgico que age seletivamente nos receptores D2-símile.

RESULTADOS

A **Tabela 1** mostra os efeitos da administração de mazindol, pimozida e apomorfina, sozinhos ou associados sobre o *binding* de 3H-NMS em córtex motor de ratos. O mazindol 10 mg/kg, v.o., aumentou em torno de 31 % a densidade dos receptores M1 + M2-símile ($548,4 \pm 41,79$ fmol/mg de proteína) em relação ao controle ($418,4 \pm 17,16$ fmol/mg de proteína). Por outro lado, a pimozida 10 mg/kg, não teve efeito significativo ($378,6 \pm 23,63$ fmol/mg de proteína), enquanto na maior dose (20 mg/kg), promoveu uma diminuição de 17 % ($348,6 \pm 22,00$ fmol/mg de proteína). Quando administrado 30 minutos antes do mazindol, pimozida nas doses de 10 e 20 mg/kg promoveu reduções de 32 ($372,1 \pm 34,37$ fmol/mg de proteína) e 34 % ($359,8 \pm 10,76$ fmol/mg de proteína) quando comparada ao mazindol sozinho.

A apomorfina 1 mg/kg, i.p., não alterou a densidade dos receptores M1 + M2-símile ($395,6 \pm 24,57$ fmol/mg de proteína) quando comparada ao grupo controle. Entretanto, quando a pimozida na maior dose (20 mg/kg) foi administrada em associação com a apomorfina ($262,6 \pm 25,42$ fmol/mg de proteína) houve uma diminuição de 37 e 34 % quando comparado ao controle e apomorfina, respectivamente.

Os efeitos da administração de mazindol, pimozida e apomorfina, sozinhos ou associados sobre a densidade de receptores M1 e M2-símile em córtex motor de ratos são apresentados na **Tabela 2**. O Mazindol causou um aumento de 40 % nos receptores M1-símile ($261,6 \pm 31,28$ fmol/mg de proteína) e não alterou significativamente a densidade de M2-símile ($139,3 \pm 25,28$ fmol/mg de proteína) quando comparados aos

respectivos controles (M1 = $187,4 \pm 14,15$ fmol/mg de proteína; M2 = $147,5 \pm 10,44$ fmol/mg de proteína). A pimozida nas doses de 10 e 20 mg/kg não alterou a densidade de M1-símile (pimozida 10 mg/kg = $181,6 \pm 13,52$ fmol/mg de proteína; pimozida 20 mg/kg = $203,5 \pm 8,68$ fmol/mg de proteína) em relação ao controle. Entretanto, promoveu diminuições em M2-símile de 30 e 25 % ($103,9 \pm 12,59$ e $110,6 \pm 14,45$ fmol/mg de proteína, respectivamente).

O aumento observado em M1-símile com o mazindol sozinho, não foi detectado quando esta droga foi administrada em associação com a pimozida nas doses de 10 e 20 mg/kg ($219,8 \pm 19,57$ fmol/mg de proteína, respectivamente). Em M2-símile foi observado que nas associações de pimozida 10 ou 20 mg/kg com mazindol, os resultados foram semelhantes àqueles detectados com pimozida sozinha (pim 10 + maz 10 = $110,6 \pm 14,45$ fmol/mg de proteína; pim 20 + maz 10 = $111,9 \pm 19,76$ fmol/mg de proteína).

A apomorfina sozinha, causou um aumento de 49 % nos receptores M1-símile ($279,6 \pm 55,39$ fmol/mg de proteína) e uma diminuição de 32 % no número de M2-símile ($100,6 \pm 9,00$ fmol/mg de proteína). Entretanto, o aumento observado em M1-símile parece ser o efeito predominante. Os efeitos da apomorfina quando administrada em associação com a pimozida sobre os receptores M1-símile (pim 10 + apo 1 = $319,6 \pm 63,35$ fmol/mg de proteína); pim 20 + maz 10 = $292,9 \pm 44,31$ fmol/mg de proteína) e M2-símile (pim 10 + apo 1 = $87,8 \pm 7,88$ fmol/mg de proteína; pim 20 + apo 1 = $88,1 \pm 15,04$ fmol/mg de proteína) foram semelhantes àqueles observados com apomorfina sozinha.

A **Tabela 3** mostra um aumento no Bmax e nos valores de Kd nos ratos tratados com maz 10 (Bmax= 681 ± 79 fmol/mg de proteína) quando comparados ao controle (Bmax= 422 ± 44 fmol/mg de proteína; Kd= 0,41 ± 0,07 nM). A **Figura 1** apresenta um gráfico representativo de Scatchard evidenciando o aumento de Bmax e Kd no grupo tratado com mazindol (Bmax= 644 fmol/mg de proteína; Kd= 0,64 nM). A pimozida 20 mg/kg, v.o., quando associada ao mazindol, bloqueou o efeito desta droga, reduzindo o valor de Bmax e aumentando o valor de Kd (Bmax= 365 fmol/mg de proteína; Kd= 0,76 nM). Os resultados apresentados na **Figura 2** mostram que enquanto a pimozida causou diminuições de Bmax e Kd (Bmax= 284 fmol/mg de proteína; Kd= 0,31 nM), a apomorfina, 1 mg/kg, i.p., aumentou os valores destes parâmetros (Bmax= 359 fmol/mg de proteína; Kd= 0,90 nM). A pimozida 20 mg/kg quando administrado 30 minutos antes da apomorfina bloqueou o efeito da apomorfina, diminuindo os valores de Bmax e Kd (Bmax= 291 fmol/mg de proteína; Kd= 0,68 nM).

Tabela 1 - Efeito da pimozida, mazindol e apomorfina sozinhos ou em combinação sobre o *binding* de 3H-NMS em córtex motor cerebral de rato

Tratamento	3H-NMS (fmol/mg de proteína)
Controle	418, 4 ± 17,16 (25)
maz 10	548,4 ± 41,79 (15) a
pim 10	378,6 ± 23,63 (13)
pim 20	348,6 ± 22,00 (12) a
pim 10 + maz 10	372,1 ± 34,37 (06) b
pim 20 + maz 10	359,8 ± 10,76 (06) a,b
apo 1	395,6 ± 24,57 (10)
pim 10 + apo 1	389,1 ± 24,35 (10)
pim 20 + apo 1	262,6 ± 25,42 (09) a,c,d

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz 10), pimozida 10 ou 20 mg/kg, v.o., (pim 10 ou pim 20), sozinhos ou associados com mazindol (pim 10 + maz 10; pim 20 + maz 10), apomorfina 1 mg/kg, i.p., (apo 1), sozinha ou associada com pimozida (pim 10 + apo 1; pim 20 + apo 1). Os dados são apresentados como média ± EPM do número de experimentos em parênteses. Para análise estatística foi utilizada ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. **a, b, c** e **d** quando comparado ao controle, maz 10, pim 20 ou apo 1, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Efeito da pimozida, mazindol e apomorfina sozinhos ou em combinação sobre a densidade de receptores M1 e M2-símile em córtex motor cerebral de rato

Tratamento	3H-NMS + cbc (M1-símile)	3H-NMS + PZ (M2-símile)
Controle	187,4 ± 14,15 (12)	147,5 ± 10,44 (12)
maz 10	261,6 ± 31,28 (07)a	139,3 ± 25,28 (08)
pim 10	181,6 ± 13,52 (09)	103,9 ± 12,59 (08)a
pim 20	203,5 ± 8,68 (08)	110,6 ± 14,45 (08)a
pim 10 + maz 10	219,8 ± 19,57 (08)	111,9 ± 19,97 (08)a
pim 20 + maz 10	222,5 ± 38,23 (08)	96,5 ± 14,10 (08)a
apo 1	279,6 ± 55,39 (07)a	100,6 ± 9,00 (08)a
pim 10 + apo 1	319,6 ± 63,35 (07)a	87,8 ± 7,88 (08)a
pim 20 + apo 1	292,9 ± 44,31 (08)a	88,1 ± 15,54 (08)a

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz 10) e com pimozida 10 ou 20 mg/kg, v.o., (pim 10 ou pim 20), que foi administrado sozinho ou associado com mazindol (pim 10 + maz 10; pim 20 + maz 10), apomorfina 1 mg/kg, i.p., (apo 1), sozinha ou associada com pimozida (pim 10 + apo 1; pim 20 + apo 1). O *binding* de 3H-NMS foi executado na presença de 200 µM de carbacol e 40 µM de pirenzepina para bloquear os receptores M2 e M1-símile respectivamente. Os dados em fmol/mg de proteína são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística foi utilizada ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. a quando comparado ao controle (p < 0,05).

Tabela 3 - Efeito do mazindol sobre os receptores muscarínicos (Bmax e Kd) em córtex motor de rato

	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	422 ± 44 (07)	0,41 ± 0,07 (07)
maz 10	681 ± 79 (07) a	0,71 ± 0,12 (06) a

Os ratos foram tratados diariamente com mazindol (10 mg/kg, v.o.) durante 1 semana. Os dados são apresentados como média ± EPM do número de experimentos em parênteses. **a**= p < 0,05 quando comparado ao controle (teste t de Student).

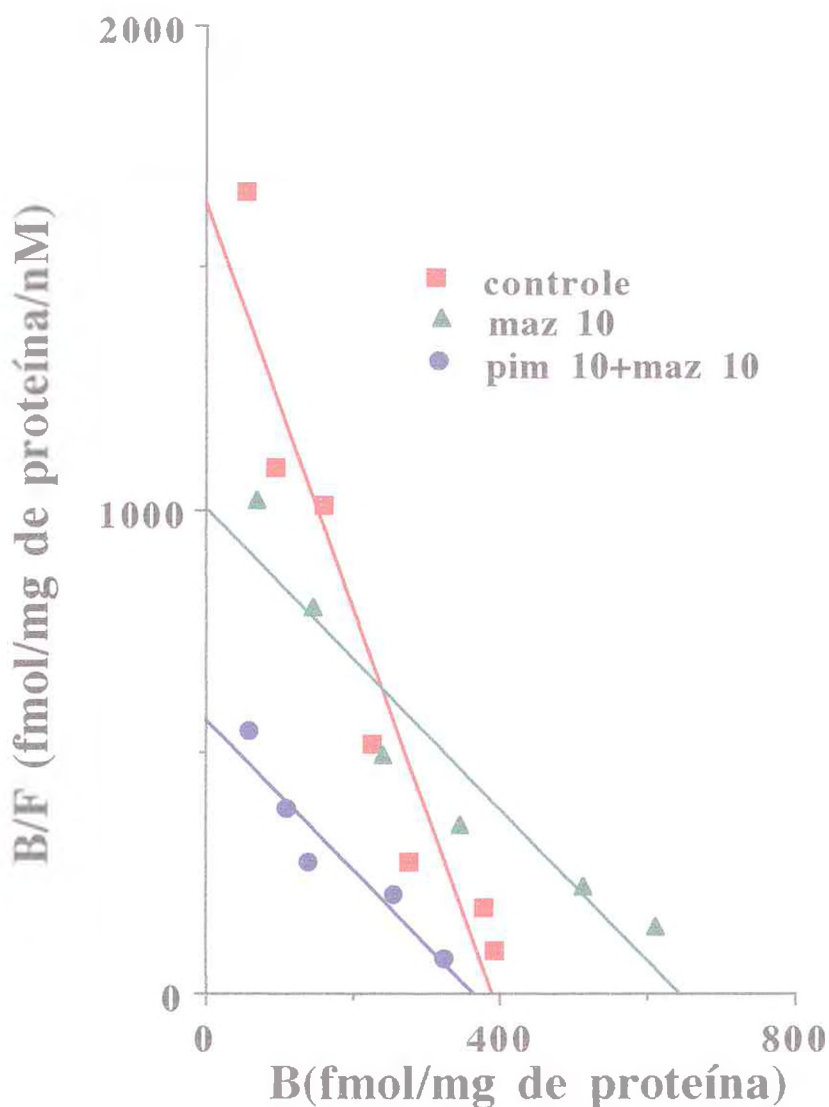


Figura 1 - Representação gráfica de Scatchard do *binding* de 3H-NMS em córtex motor de ratos controles e tratados com mazindol ou com pimozida associada com mazindol. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com salina (controle: $B_{max}= 405$; $K_d= 0,20$); mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz 10: $B_{max}= 644$; $K_d= 0,64$), ou pimozida 20 mg/kg, v.o., administrada 30 minutos antes do mazindol (pim 20+maz 10: $B_{max}= 365$; $K_d= 0,76$). Os valores de B_{max} e K_d são expressos em fmol/mg de proteína e nM, respectivamente.

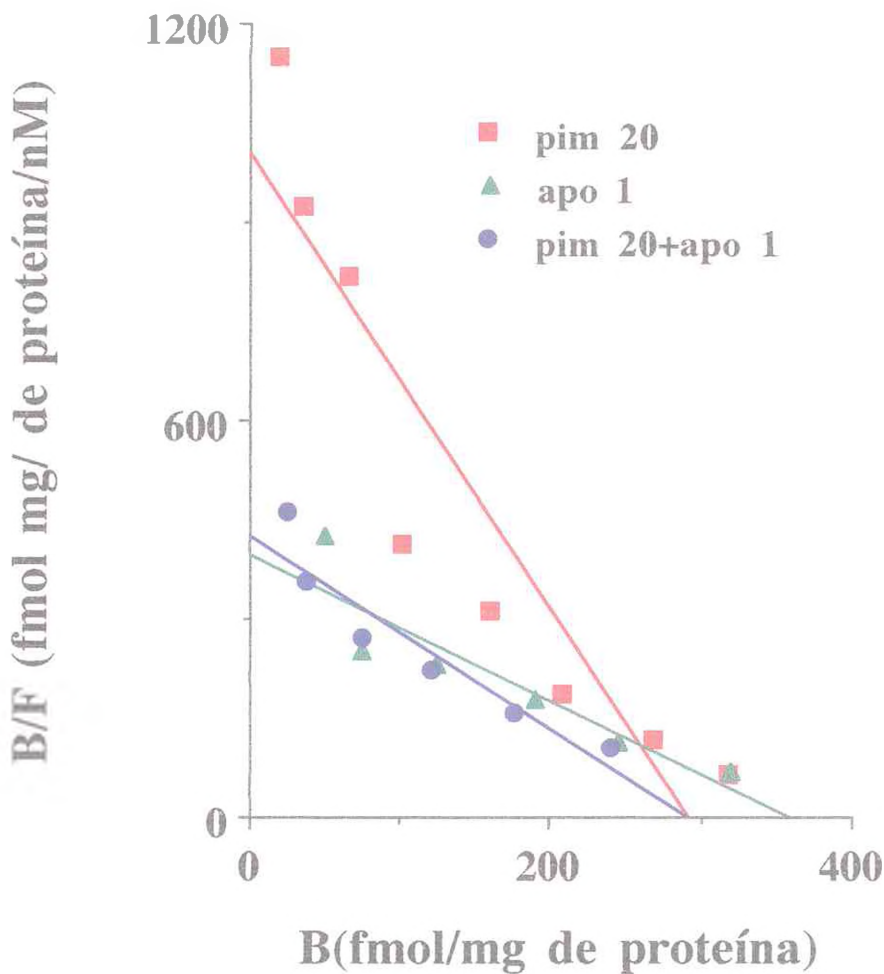


Figura 2 - Representação gráfica de Scatchard do *binding* de $^3\text{H-NMS}$ em córtex motor de ratos tratados com pimozida, apomorfina ou pimozida associada à apomorfina. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com pimozida 20 mg/kg, v.o., (pim 20: $B_{\text{max}}=284$; $K_d=0,31$); apomorfina 1 mg/kg, i.p., (apo 1: $B_{\text{max}}=359$; $K_d=0,90$), ou pimozida 20 mg/kg, v.o., administrada 30 minutos antes da apomorfina 1 mg/kg, i.p., (pim 20+apo 1: $B_{\text{max}}=291$; $K_d=0,68$). Os valores de B_{max} e K_d são expressos em fmol/mg de proteína e nM, respectivamente.

DISCUSSÃO

Embora as drogas neurolépticas tenham em comum a habilidade de antagonizar os receptores dopaminérgicos, elas também se ligam a outros tipos de receptores, apresentando, portanto, algumas vezes efeitos diversificados (Andersen *et al.*, 1992). Assim, enquanto o haloperidol aumenta os receptores dopaminérgicos D2 marcados pelo 3H-espiroperidol, a pimozida causa uma diminuição destes receptores e não provoca nenhuma alteração na densidade de receptores muscarínicos marcados pelo 3H-QNB (Tecott *et al.*, 1986).

No presente estudo, usando o ligante 3H-NMS foi observado que a pimozida reduziu, significativamente, a densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2) em córtex motor de ratos e que este efeito foi preferencialmente sobre os receptores do subtipo M2. Quando administrada em associação com o mazindol, a pimozida bloqueou o aumento ocorrido por esta droga em M1 + M2-símile e M2-símile, considerando que os valores obtidos com a associação foram menores do que aqueles observados com o mazindol sozinho. Alguns antagonistas dopaminérgicos também possuem atividade anticolinérgica *in vivo*. Entretanto, segundo Niemegeers & Jansen, (1979) a pimozida é um neuroléptico desprovido de propriedades anticolinérgicas.

A literatura mostra haver uma interrelação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico em corpo estriado de rato (Bertorelli *et al.*, 1992). Por exemplo, sabe-se que a função de neurônios colinérgicos é controlada pela dopamina. As primeiras evidências indicavam que a dopamina inibia a liberação de acetilcolina, diretamente através de receptores D2 localizados em neurônios colinérgicos estriatais (Bertorelli *et al.*, 1990; Consolo *et al.*, 1992; Damsma *et al.*, 1990b).

Takeyasu *et al.*, (1979) mostraram que ratos tratados cronicamente com haloperidol não apresentavam atividade dopaminérgica, o que poderia ser resultado de hipersensibilidade dopaminérgica e subsequente hiposensibilidade colinérgica.

Wang *et al.*, (1993) observaram que a ativação de receptores dopaminérgicos D2 com o agonista D2 quinpirole ou de receptores muscarínicos com o carbacol induziram uma inibição da liberação de acetilcolina no corpo estriado. Também foi demonstrado por Ikawa *et al.*, (1993) que se o *turnover* de dopamina aumenta ou diminui, ocorre respectivamente, um aumento ou diminuição dos sítios de captação de dopamina. Após o tratamento crônico com mazindol, houve um aumento dos receptores muscarínicos. Assim, o aumento na concentração de dopamina pelo mazindol poderia levar a uma *upregulation* dos receptores muscarínicos e o antagonista pimozida poderia bloquear este efeito.

Takeyasu *et al.*, (1979) mostraram que o tratamento crônico de ratos com 6-OH-dopamina induziu um estado de hipersensibilidade dopaminérgica que foi acompanhado por uma diminuição no *binding* de 3H-atropina em corpo estriado de rato. Estes resultados sugerem um efeito direto dos neurônios dopaminérgicos sobre a atividade colinérgica no corpo estriado. Também foi demonstrado em experimentos *in vitro* que o *binding* do 3H-QNB foi aumentado pelos agonistas dopaminérgicos dopamina e apomorfina (Takeyasu *et al.*, 1979).

Embora a maioria dos trabalhos citados na literatura descrevam uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico em corpo estriado de rato, o presente trabalho sugere que um fenômeno similar ocorre também no córtex cerebral. Assim, agonistas dopaminérgicos tais

como mazindol e apomorfina aumentaram o número de receptores muscarínicos em córtex motor de ratos, atuando predominantemente sobre os receptores do subtipo M1. Enquanto apomorfina causou um pequeno aumento nos receptores M1-símile, reduziu os receptores M2-símile, dando como consequência ausência de efeito final devido às ações opostas do composto. A pimozida, entretanto, foi incapaz de bloquear o aumento ocorrido nos receptores M1-símile induzido pela apomorfina, mas ao invés continuou causando uma diminuição de M2-símile na presença da apomorfina sugerindo uma ação preferencial sobre M2-símile. A apomorfina de maneira diferente do mazindol, diminuiu os receptores do subtipo M2-símile, indicando mecanismos diferentes, com relação ao subtipo de receptor envolvido.

Estudos anteriores (Sonsalla *et al.*, 1988) mostraram que o bloqueio dos receptores D1 ou D2 é suficiente para prevenir a resposta locomotora induzida pela anfetamina que facilita a liberação endógena de dopamina, e pelo GBR 13069, que como o mazindol é um inibidor da recaptção de dopamina. Entretanto, um significativo bloqueio da resposta locomotora induzida pela apomorfina somente foi observado após a administração concomitante de antagonistas que atuam tanto em D1 como em D2. No presente trabalho, a pimozida que é um antagonista predominantemente D2 não conseguiu bloquear o aumento induzido pela apomorfina nos receptores do subtipo M1, indicando que o receptor D2 não parece ter um papel relevante no efeito da apomorfina sobre este subtipo de receptor muscarínico.

A literatura mostra que os receptores D1 e D2 têm efeitos opostos sobre a liberação acetilcolina (Bertorelli *et al.*, 1990). Foi demonstrado que a apomorfina que é um agonista dos receptores D1 e D2 não apresentou efeito colinérgico *in vivo* (Invernizzi *et al.*, 1989; Westerink

et al., 1989). Entretanto, esta droga, após bloqueio dos receptores D1 reduziu a liberação de acetilcolina, sugerindo uma influência inibitória tônica do sistema dopaminérgico nigroestriatal sobre o sistema colinérgico (Lehman & Langer, 1983).

O efeito da administração concomitante de pimizida e apomorfina sobre os receptores M1 e M2-símile foi semelhante ao observado com apomorfina sozinha. Já uma diminuição foi detectada nos receptores M1 + M2 quando da associação de pimizida (na maior dose) e apomorfina quando comparado a apomorfina sozinha ou ao controle. É possível que a diminuição observada seja resultado da redução observada em M2-símile nos grupos tratados apenas com apomorfina ou pimizida.

Experimentos de saturação mostraram um aumento significativo nos valores de K_d no *binding* de 3H-NMS de animais tratados com os agonistas dopaminérgicos, mazindol e apomorfina, indicando uma diminuição da afinidade do ligante para os sítios de *binding* nestas condições.

Existem evidências (Peroutka & Snyder, 1980) de que algumas drogas antipsicóticas têm alta afinidade não somente para receptores dopaminérgicos e serotoninérgicos, mas também para receptores alfa-adrenérgicos, histaminérgicos ou muscarínicos. Wang *et al.*, 1993, mostraram que os receptores dopaminérgicos D1 e D2 são provavelmente regulados por mecanismos diferentes. De acordo com estes autores esta dessensibilização funcional seletiva dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 pode ser induzida pelo tratamento crônico com agonistas específicos D1 e D2, respectivamente.

O presente estudo mostra diferenças na interação dopamina-acetilcolina quando relaciona o tratamento crônico com agonistas diretos e indiretos ou antagonistas D2. O esclarecimento destes mecanismos é importante para o desenvolvimento de tratamentos de desordens das funções dopaminérgicas ou colinérgicas.

CONCLUSÕES

- Há uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico em córtex motor de ratos no que se refere à regulação da densidade de receptores muscarínicos.

- O mazindol aumentou a densidade de receptores muscarínicos e este efeito foi bloqueado pela pimozida, indicando que, pelo menos em parte, esta ação do mazindol sobre a *upregulation* dos receptores muscarínicos é mediada pelo sistema dopaminérgico e que os receptores D2-símile exercem um importante papel neste fenômeno.

- O mazindol aumentou a densidade de receptores muscarínicos, sendo esse aumento preferencialmente sobre M1-símile.

- O efeito da apomorfina em M1 + M2-símile parece ser consequência de efeitos opostos em M1 e M2-símile, considerando que esta droga aumentou M1-símile, mas diferentemente diminuiu M2-símile.

PROTOCOLO III

**Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos
sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos
em corpo estriado de rato**

INTRODUÇÃO

Embora a interação entre dopamina e acetilcolina seja claramente importante para a função normal do corpo estriado, os mecanismos precisos de como esta interação ocorre ainda não são bem definidos.

É evidente que a doença de Parkinson ocorre devido a uma degeneração do corpo estriado que leva a um desequilíbrio dos sistemas dopaminérgico e colinérgico e que drogas que atuam nos receptores dopaminérgicos e colinérgicos podem reverter os sintomas dessa doença.

Muitos estudos já foram desenvolvidos mostrando o controle dopaminérgico sobre a liberação de acetilcolina no corpo estriado. Estudos de microdiálise indicam que agonistas do receptor D1 aumentam, enquanto antagonistas diminuem a liberação de acetilcolina, sugerindo um papel facilitatório do receptor D1 sobre a liberação de acetilcolina (Damsma *et al.*, 1990a).

Dados da literatura mostraram que a anfetamina aumenta a concentração de dopamina extracelular e aumenta também a concentração extracelular de acetilcolina no corpo estriado. Este efeito é bloqueado pelo SCH 23390 ou pela depleção dos estoques de dopamina (Consolo *et al.*, 1992).

Estes mesmos autores observaram que o raclopride um antagonista D2 seletivo do mesmo modo aumentou a liberação de acetilcolina no corpo estriado e este efeito foi bloqueado pelo antagonista D1-seletivo, SCH 23390, sugerindo que os neurolépticos aumentam a liberação de acetilcolina através de um duplo mecanismo (Damsma *et al.*, 1991b).

OBJETIVOS

É bem estabelecido a existência da interação entre dopamina e acetilcolina no corpo estriado no que se refere a liberação desses neurotransmissores. Entretanto, pouco ou quase nenhum estudo foi desenvolvido para verificar a influência dessa interação sobre a regulação de receptores muscarínicos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de agonistas (mazindol e apomorfina) e antagonistas dopaminérgicos (pimozida e sulpirida) sozinhos ou associados sobre a densidade de receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato.

RESULTADOS

A **Tabela 1** apresenta os efeitos do mazindol, pimozida, apomorfina e sulpirida sozinhos ou em associação sobre os receptores M1 + M2 em corpo estriado de rato. Os resultados mostraram um aumento de 37 % do número de receptores muscarínicos causado pelo mazindol ($589,5 \pm 37,54$ fmol/mg de proteína) em relação ao controle ($430,5 \pm 18,05$ fmol/mg de proteína). Por outro lado, a apomorfina não apresentou efeito significativo ($470,8 \pm 39,13$ fmol/mg de proteína).

A pimozida sozinha ($493,5 \pm 26,85$ fmol/mg de proteína) ou associada ao mazindol ($517,5 \pm 46,45$ fmol/mg de proteína) ou à apomorfina ($517,5 \pm 46,45$ fmol/mg de proteína) não apresentou efeito significativo, embora tenha apresentado uma tendência a um aumento na densidade destes receptores. A sulpirida sozinha apresentou uma tendência para um aumento em torno de 20 % do número de receptores ($517,7 \pm 34,02$ fmol/mg de proteína) em relação ao controle, mas quando associada ao mazindol ($485,7 \pm 38,02$ fmol/mg de proteína) bloqueou o efeito observado com esta droga sozinha. Quando associada com apomorfina, a sulpirida não apresentou nenhum efeito significativo ($426,5 \pm 5,10$ fmol/mg de proteína) (**Tabela 1**).

Os efeitos de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos do subtipo M1-símile são mostrados na **Tabela 2**. Embora não significativo, o mazindol produziu uma tendência para aumento (16 %) dos receptores M1-símile ($283,3 \pm 15,18$ fmol/mg de proteína) quando comparado ao controle ($244,0 \pm 11,43$ fmol/mg de proteína). Não foram observados efeitos significativos com pimozida sozinha ($259,5 \pm 18,65$ fmol/mg de proteína) ou em associação com

mazindol ($260,0 \pm 19,61$ fmol/mg de proteína) ou apomorfina ($259,7 \pm 23,89$ fmol/mg de proteína).

Uma tendência para um aumento (20 %) foi detectada com apomorfina ($291,9 \pm 28,22$ fmol/mg de proteína). A sulpirida sozinha ($237,8 \pm 15,22$ fmol/mg de proteína) ou em associação com o mazindol ($249,0 \pm 14,26$ fmol/mg de proteína) não produziu efeitos significativos. Entretanto, um pequeno, mas significativo efeito foi detectado com a associação de sulpirida + apomorfina ($206,2 \pm 13,85$ fmol/mg de proteína) quando comparado ao controle e apomorfina (**Tabela 2**).

Os resultados sobre os receptores M2-símile são apresentados na **Tabela 3**. Nenhum efeito foi demonstrado com mazindol ($27,5 \pm 3,29$ fmol/mg de proteína) ou pimozida sozinhas ($26,7 \pm 2,65$ fmol/mg de proteína) quando comparados ao controle ($25,8 \pm 0,93$ fmol/mg de proteína). Entretanto, aumentos de 21 e 48 % foram observados com a associação de pimozida + mazindol ($31,1 \pm 1,78$ fmol/mg de proteína) e no grupo tratado com apomorfina ($38,1 \pm 1,44$ fmol/mg de proteína), respectivamente.

O aumento ocorrido no número de receptores M2-símile nos ratos tratados com apomorfina foi bloqueado pelo pré-tratamento com a pimozida ($26,2 \pm 1,78$ fmol/mg de proteína). A sulpirida sozinha ($25,4 \pm 1,73$ fmol/mg de proteína) ou em associação com o mazindol ($27,5 \pm 1,31$ fmol/mg de proteína) não apresentou efeitos significativos. Entretanto, sulpirida bloqueou o efeito da apomorfina, e esta associação diminuiu em torno de 18, 44 e 17 % o número de receptores quando comparado ao controle, apomorfina e sulpirida sozinha, respectivamente (**Tabela 3**).

A **Tabela 4** mostra os efeitos de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* de 3H-SCH 23390. O mazindol e a pimozida aumentaram em torno 60 ($261,0 \pm 16,89$ fmol/mg de proteína) e 50 % ($231,6 \pm 13,43$ fmol/mg de proteína), respectivamente, o número de receptores D1-símile quando comparados ao controle ($163,2 \pm 14,50$ fmol/mg de proteína). Este aumento foi potenciado na associação de pimozida + mazindol ($357,6 \pm 33,72$ fmol/mg de proteína). Por outro lado, a apomorfina, sozinha, foi desprovida de efeito ($156,1 \pm 17,96$ fmol/mg de proteína). Entretanto, um significativo aumento foi observado no grupo tratado com pimozida + apomorfina ($307,0 \pm 15,40$ fmol/mg de proteína). Nenhum efeito significativo foi observado nos receptores D1-símile no grupo tratado com sulpirida sozinha ($142,9 \pm 9,95$ fmol/mg de proteína) ou associada com a apomorfina ($136,8 \pm 8,02$ fmol/mg de proteína). Contudo, na associação de sulpirida + mazindol ($184,1 \pm 6,96$ fmol/mg de proteína) a sulpirida bloqueou o efeito visto com o mazindol sozinho.

Os efeitos de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* do 3H-espiroperidol são apresentados na **Tabela 5**. Um aumento significativo (15 %) foi detectado nos receptores D2-símile no grupo tratado com mazindol ($261,6 \pm 13,63$ fmol/mg de proteína) quando comparado ao controle ($228,4 \pm 9,94$ fmol/mg de proteína). Os resultados obtidos com a associação de pimozida + mazindol ($224,1 \pm 18,02$ fmol/mg de proteína) foram próximos aos valores obtidos com o controle, mas apresentaram uma tendência a serem diferentes daqueles obtidos com o mazindol sozinho.

A pimozida sozinha não causou alteração significativa ($230,4 \pm 15,12$ fmol/mg de proteína). A apomorfina foi desprovida de efeito ($229,0 \pm 22,57$ fmol/mg de proteína), e similarmente nenhuma alteração

foi observada com sulpirida sozinha ($247,6 \pm 14,65$ fmol/mg de proteína) ou em associação com apomorfina ($229,3 \pm 19,57$ fmol/mg de proteína). Similarmente à pimozida, sulpirida apresentou uma tendência para bloquear ($226,6 \pm 10,88$ fmol/mg de proteína) o aumento ocorrido nestes receptores causado pelo mazindol.

A **Tabela 6** apresenta os resultados de experimentos *in vitro* com agonistas e antagonistas dopaminérgicos, a fim de detectar possíveis interações destas drogas com receptores muscarínicos. Os resultados mostraram diminuições de 34 e 26 % no *binding* de 3H-NMS com mazindol ($377,8 \pm 17,23$ fmol/mg de proteína) e apomorfina ($425,8 \pm 36,37$ fmol/mg de proteína), respectivamente, quando comparados ao controle ($575,6 \pm 11,70$ fmol/mg de proteína). Pimozida e sulpirida não apresentaram efeitos significativos ($564,3 \pm 46,98$ e $564,3 \pm 46,98$ fmol/mg de proteína, respectivamente).

Os dados da Análise de Scatchard são apresentados na **Tabela 7**. Houve um aumento nos valores de B_{max}, mas não nos valores de K_d no grupo tratado com mazindol (B_{max}= $748,2 \pm 99,40$ fmol/mg de proteína; K_d= $1,03 \pm 0,330$ nM) quando comparado ao grupo controle (B_{max}= $511,4 \pm 32,67$ fmol/mg de proteína; K_d= $0,76 \pm 0,240$ nM). Pimozida sozinha, mostrou uma tendência para aumento (27 %) no valor de B_{max} ($648,1 \pm 33,88$ fmol/mg de proteína) e produziu um aumento significativo no K_d ($2,00 \pm 0,500$ nM). A associação de pimozida + mazindol bloqueou o aumento observado no B_{max} ($586,2 \pm 26,62$ fmol/mg de proteína), mas não alterou os valores de K_d ($1,42 \pm 0,280$ nM). Apomorfina sozinha ou em associação com a pimozida não provocou nenhuma alteração nos valores de B_{max} ($535,8 \pm 41,26$ e $528,4 \pm 34,74$ fmol/mg de proteína, respectivamente). Entretanto, enquanto o K_d do grupo tratado com apomorfina sozinha não foi

alterado ($1,08 \pm 0,150$ nM), sua associação com pimozida aumentou os valores de K_d ($2,82 \pm 0,660$ nM) quando comparado ao controle ou apomorfina sozinha. O tratamento com sulpirida não alterou nem B_{max} ($564,2 \pm 20,59$ fmol/mg de proteína) nem K_d ($2,82 \pm 0,660$ nM), entretanto quando associada ao mazindol ($577,2 \pm 44,79$ fmol/mg de proteína) a sulpirida bloqueou o aumento de B_{max} visto com mazindol sozinho e não causou nenhuma alteração no valor de K_d ($0,81 \pm 0,040$ nM). A associação de sulpirida + apomorfina não promoveu efeitos significativos sobre B_{max} e K_d ($B_{max} = 569,6 \pm 61,80$ fmol/mg de proteína; $K_d = 0,91 \pm 0,180$ nM).

Tabela 1 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* de 3H-NMS (M1 + M2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-NMS (fmol/mg de proteína)
Controle	430,5 ± 18,05 (50)
maz	589,5 ± 37,54 (28) ^a
pim	493,5 ± 26,85 (24)
pim + maz	517,5 ± 46,45 (11)
apo	470,8 ± 39,13 (24)
pim + apo	513,2 ± 35,94 (11)
sul	515,7 ± 34,02 (14)
sul + maz	485,7 ± 38,02 (12)
sul + apo	426,5 ± 25,10 (12)

Os animais foram tratados diariamente durante 1 semana com mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz), pimizida 20 mg/kg, v.o., (pim), apomorfina 1 mg/kg, v.o., (apo 1) e sulpirida 100 mg/kg, v.o., (sul). No caso das associações, sulpirida ou pimizida foram administrados 30 min antes do mazindol ou apomorfina. Os animais foram mortos 24 h após a última injeção. Os dados são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. ^a quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* de 3H-NMS (M1-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-NMS + cbc (M1-símile)
Controle	244,0 ± 11,43 (35)
maz 10	283,3 ± 15,18 (13)
pim 20	259,5 ± 18,65 (13)
pim 20 + maz 10	260,0 ± 19,61 (08)
apo 1	291,9 ± 28,22 (08)
pim 20 + apo 1	259,7 ± 23,89 (11)
sul 100	237,8 ± 15,22 (18)
sul 100 + maz 10	249,0 ± 14,26 (18)
sul 100 + apo 1	206,2 ± 13,85 (18) a,b

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Os dados em fmol/mg de proteína são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. **a** e **b** quando comparado ao controle e apomorfina, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* de 3H-NMS (M2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-NMS + PZ (M2-símile)
Controle	25,8 ± 0,93 (15)
maz 10	27,5 ± 3,29 (06)
pim 20	26,7 ± 2,65 (06)
pim 20 + maz 10	31,1 ± 1,78 (06) a
apo 1	38,1 ± 1,44 (08) a
pim 20 + apo 1	26,2 ± 1,78 (06) b
sul 100	25,4 ± 1,73 (14)
sul 100 + maz 10	7,5 ± 1,31 (14)
sul 100 + apo 1	21,2 ± 0,78 (18) a,b,c

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Os dados em fmol/mg de proteína são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. **a**, **b** e **c** quando comparado ao controle, apomorfina e sulpirida, respectivamente (p < 0,05).

Tabela 4 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* de 3H-SCH 23390 (D1-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-SCH 23390 (D1-símile)
Controle	163,2 ± 14,50 (13)
maz 10	261,0 ± 16,89 (06) a
pim 20	231,6 ± 13,43 (06) a
pim 20 + maz 10	357,6 ± 33,72 (06) a
apo 1	156,1 ± 17,96 (05)
pim 20 + apo 1	307,0 ± 15,40 (06) a,c,d
sul 100	142,9 ± 9,95 (06)
sul 100 + maz 10	184,1 ± 6,96 (06) b
sul 100 + apo 1	136,8 ± 8,02 (06)

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Os dados são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. **a**, **b**, **c** e **d** quando comparado ao controle, mazindol pimizida e apomorfina, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 5 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre o *binding* de 3H-espiroperidol (D2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-espiroperidol (D2-símile)
Controle	228,4 ± 9,94 (68)
maz 10	261,6 ± 13,63 (37) ^a
pim 20	230,4 ± 15,12 (31)
pim 20 + maz 10	224,1 ± 18,02 (20)
po 1	229,0 ± 22,57 (17)
pim 20 + apo 1	256,1 ± 23,17 (18)
sul 100	247,6 ± 14,65 (19)
sul 100 + maz 10	226,6 ± 10,88 (16)
sul 100 + apo 1	229,3 ± 19,57 (18)

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Os dados são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. **a** quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos presentes no *binding* de 3H-NMS (M1 + M2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-NMS (M1 + M2-símile)
Controle	575,6 ± 11,70 (04)
mazindol	377,8 ± 17,23 (04) ^a
pimozida	564,3 ± 46,98 (04)
sulpirida	517,9 ± 7,41 (04)
apomorfina	425,8 ± 36,37 (04) ^a

O ligante (3H-NMS 2,35 nM) foi incubado por 30 minutos com o tampão contendo mazindol, pimozida, sulpirida ou apomorfina (100 µM cada), antes da filtração, os ensaios (em duplicata) foram executados como descrito na **Tabela 1**. Os dados são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. **a** quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 7 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre os valores de Bmax e Kd no *binding* de 3H-NMS (M1 + M2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	Bmax (fmol/mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	511,4 ± 32,67 (04)	0,76 ± 0,240 (04)
maz 10	748,2 ± 99,40 (04) a	1,03 ± 0,330 (04)
pim 20	648,1 ± 33,88 (04)	2,00 ± 0,500 (04) a
pim 20 + maz 10	586,2 ± 26,62 (03) b	1,42 ± 0,280 (03)
apo 1	535,8 ± 41,26 (03)	1,08 ± 0,150 (03)
pim 20 + apo 1	528,4 ± 34,74 (04)	2,82 ± 0,660 (04) a,c
sul 100	564,2 ± 20,59 (04)	1,33 ± 0,420 (04)
sul 100 + maz 10	577,2 ± 44,79 (03) b	0,81 ± 0,040 (03)
sul 100 + apo 1	569,6 ± 61,80 (04)	0,91 ± 0,180 (04)

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Os dados em fmol/mg de proteína são apresentados como média ± EPM do número de experimentos mostrados em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. **a**, **b** e **c**, quando comparado ao controle, mazindol e apomorfina, respectivamente (p < 0,05).

DISCUSSÃO

Como apresentado anteriormente (PROTOCOLO I) o mazindol, um agonista dopaminérgico indireto aumentou o *binding* de 3H-NMS no córtex motor cerebral e este efeito não foi evidenciado quando esta droga estava associada com a pimozida, uma droga neuroléptica e antagonista D2. Os resultados em corpo estriado mostraram que o mazindol também aumentou o número de receptores muscarínicos, e este aumento foi também preferencialmente sobre os receptores do subtipo M1-símile.

Entretanto, diferentemente do que ocorreu em córtex motor este efeito não foi bloqueado pela pimozida, mas houve uma tendência a ser bloqueado pela sulpirida, um outro antagonista D2. Pelo contrário a pimozida sozinha ou em associação com o mazindol apresentou uma tendência a aumentar a densidade de receptores muscarínicos (M1 + M2), efeito este intrigante, considerando que a pimozida não produziu alteração significativa sobre os receptores M1 ou M2-símile, separadamente.

Há evidências de que manipulações no sistema dopaminérgico podem afetar as funções colinérgicas. Parece que na presença de atividade dopaminérgica aumentada ocorre uma diminuição da liberação de acetilcolina. Sethy *et al.*, (1985) mostraram que o agonista dopaminérgico apomorfina aumentou os níveis estriatais de acetilcolina, produzindo uma diminuição na liberação de acetilcolina, enquanto o antagonista dopaminérgico, haloperidol diminuiu o nível de acetilcolina estriatal, conseqüente a um aumento na liberação de acetilcolina. Há evidências de que o efeito inibitório da dopamina sobre a liberação de acetilcolina ocorre via receptores D2 no corpo estriado (Levin *et al.*,

1990). No presente trabalho a apomorfina causou um aumento no número de receptores do subtipo M2, mostrando ocorrer uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico. Este efeito foi bloqueado pela pimozida e sulpirida que não apresentaram efeito nenhum isoladamente. Provavelmente, a apomorfina, que age em receptores D1 e D2-símile, afetou o sistema colinérgico através de sua ação nos receptores D2-símile, considerando que seu efeito sobre este sistema foi bloqueado por antagonistas D2.

Albures e colaboradores (1993) mostraram que o tratamento com cocaína (15 mg/kg, i.p., 2 vezes ao dia) promoveu um aumento dos receptores D1 símile sem alterar o subtipo D2-símile. Do mesmo modo, no presente trabalho, o mazindol, um inibidor da recaptação de dopamina semelhante à cocaína, causou um aumento de D1-símile, mas também aumentou o número de receptores D2-símile. O aumento observado nos receptores do subtipo D1 poderia indicar que o sistema dopaminérgico está se tornando desensibilizado em resposta ao tratamento com o mazindol. Alternativamente, poderia ocorrer uma *upregulation* na população de receptores D1-símile em resposta a redução sináptica nos níveis de dopamina provocado pelo tratamento crônico com mazindol. Também foi observado que a inibição da recaptação de dopamina induzida pelo mazindol envolvia uma alteração na densidade de receptores D2-símile, sugerindo processos regulatórios similares para os receptores D1 e D2 após o tratamento com mazindol em corpo estriado de rato.

É sabido que a sulpirida seletivamente bloqueia os receptores D2 (Spano *et al.*, 1978; Spano *et al.*, 1983) e o tratamento crônico com doses antidepressivas induzem uma desensibilização de ambos os subtipos de receptores D1 e D2 estriatais. É interessante notar que a

administração de altas doses deste composto resultou numa *upregulation* seletiva dos receptores D2 estriatais sem alteração nos receptores D1-símile. Estes dados sugerem, que quando administrado em baixas doses, este composto provavelmente age preferencialmente bloqueando os receptores D2 pré-sinápticos, controlando desta forma a liberação de dopamina no corpo estriado. Este bloqueio que resulta em uma secreção aumentada de dopamina pode ser responsável pela *downregulation* de ambos os subtipos de receptores D1 e D2-símile. Interessantemente, a adaptação dos receptores dopaminérgicos a baixas doses de *l*-sulpirida, bem como a depleção de dopamina induzida pela reserpina, envolveu uma alteração na função do receptor sem mudança em sua densidade (Missale *et al.*, 1989). O tratamento crônico com baixas doses de *l*-sulpirida não modifica a atividade funcional dos receptores dopaminérgicos localizados no córtex frontal, sugerindo uma diferente regulação na plasticidade dos receptores dopaminérgicos nesta área cerebral (Sigala *et al.*, 1991).

Outros trabalhos demonstraram que o haloperidol e a sulpirida não alteram nem os valores de Bmax nem os Kd no *binding* do SCH 23390 (Porceddu *et al.*, 1986). Similarmente, no presente trabalho a sulpirida não alterou a densidade de receptores D1-símile. Entretanto, a pimozida diferente dos outros antagonistas D2, haloperidol e sulpirida, aumentou a densidade de receptores D1-símile. De fato, esta droga quando associada ao mazindol, potenciou os efeitos do mazindol sozinho. A incapacidade da sulpirida em alterar os sítios marcados pelo 3H-SCH 23390 pode indicar que este antagonista dopaminérgico interage preferencialmente com os receptores D2-símile. Apesar da sulpirida não apresentar efeito nos receptores D2-símile, ele bloqueou os efeitos observados com o mazindol. É possível que a sulpirida tenha interagido

com receptores D2 pré-sinápticos diminuindo a liberação de dopamina e assim atenuando o efeito do mazindol.

A administração crônica de neurolépticos clássicos, incluindo flufenazina é normalmente associada com um aumento na densidade ou sensibilidade de receptores dopaminérgicos estriatais D2-símile, enquanto a administração de clozapina, usualmente (Creese & Snyder, 1980), embora nem sempre significativa (Smith & Davis, 1976), é reportada não causar tais efeitos. O presente trabalho mostra que a pimozida e a sulpirida, ambos antagonistas D2 são desprovidos de efeito sobre o *binding* do 3H-espiroperidol.

As análises de Scatchard (experimentos de saturação) indicaram um aumento na densidade de receptores muscarínicos e nenhuma alteração na afinidade após o tratamento com mazindol. O aumento no Bmax foi bloqueado por ambos os antagonistas sem nenhuma alteração na constante de dissociação. Inesperadamente, houve uma tendência para aumento de Bmax e um aumento nos valores de Kd com pimozida, alterações estas não observadas com sulpirida. Por outro lado, apomorfina não alterou ambos os valores de Bmax ou Kd, mas quando associada à pimozida causou um significativo aumento na constante de dissociação. Este efeito é provavelmente consequência do aumento no Kd promovido pela pimozida sozinha. Entretanto, sulpirida sozinha ou em associação com apomorfina não alterou a densidade de receptores muscarínicos nem os valores da constante de dissociação.

Ambos agonistas, diretos (apomorfina) e indiretos (mazindol) causaram uma *upregulation* dos receptores muscarínicos, mas, enquanto apomorfina agiu preferencialmente sobre os receptores M2-símile, mazindol mostrou ação preferencial sobre M1-símile, indicando que

agonistas dopaminérgicos promovem *upregulation* dos receptores muscarínicos. Estes efeitos foram bloqueados por antagonistas (pimozida e sulpirida) que não apresentaram efeito isoladamente, indicando a participação dos receptores D2-símile no efeito dos agonistas.

Embora uma *downregulation* dos receptores dopaminérgicos fosse esperada após o tratamento com um agonista, a apomorfina não alterou os receptores D1 ou D2-símile e o mazindol causou uma *upregulation*. É possível que o mazindol ao aumentar os níveis de dopamina ocasionou a interação desta com receptores dopaminérgicos pré-sinápticos. Entretanto, os efeitos de agonistas indiretos são controversos. Embora se espere que as drogas neurolépticas bloqueiem os receptores D2-símile e causem *upregulation*, no presente caso, nenhuma mudança foi observada nos receptores D2 e uma *upregulation* dos receptores D1 foi observada somente com a pimozida.

Algumas das discrepâncias vistas na presente investigação quando relacionadas a outros dados na literatura, podem ser explicadas pelas diferenças na duração do tratamento, dose e via de administração. Este trabalho mostrou que as interações entre os sistemas colinérgico e dopaminérgico podem acontecer em ambas as direções, e que agonistas e antagonistas podem alterar o número de receptores muscarínicos e dopaminérgicos através de uma *upregulation* ou aumentando ou diminuindo os efeitos observados com cada droga sozinha. Também foi demonstrado através de ensaios *in vitro* que enquanto agonistas dopaminérgicos diretos ou indiretos diminuem o *binding* da 3H-NMS, antagonistas, pelo menos nas doses utilizadas, não deslocaram significativamente àquele ligante e foram portanto destituídos de efeito.

CONCLUSÕES

- Há uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico no que se refere à regulação da densidade de receptores muscarínicos em corpo estriado de rato.

- Os agonistas dopaminérgicos aumentaram a densidade de receptores muscarínicos, sendo que o mazindol aumentou preferencialmente M1-símile, enquanto apomorfina aumentou preferencialmente M2-símile.

- Mazindol e apomorfina competiram pelo *binding* de 3H-NMS, não se podendo, portanto, descartar a hipótese de que tenham agido como antagonistas muscarínicos, aumentando a densidade de receptores muscarínicos.

- O aumento dos receptores M2-símile induzido pela apomorfina foi bloqueado pela pimozida e sulpirida. Já o aumento ocorrido com o mazindol em M1 + M2-símile não foi bloqueado pela pimozida, mas houve uma tendência a ser bloqueado pela sulpirida, indicando que estes dois neurolépticos podem apresentar efeitos diferentes.

PROTOCOLO IV

**Efeito de agonista e antagonista muscarínico
e sua associação com agonistas e antagonistas dopaminérgicos
sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos
em corpo estriado de rato**

INTRODUÇÃO

Interneurônios colinérgicos estriatais são regulados diretamente por neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Kubota *et al.*, 1987). Agonistas do receptor D2 inibem a liberação de acetilcolina (Friedman *et al.*, 1990; Scatton, 1982a), enquanto agonistas do receptor D1 estimulam a liberação de acetilcolina estriatal (Damsma *et al.*, 1990b; Friedman *et al.*, 1990). Assim é concebível que tratamentos que alterem os receptores D2 possam diferencialmente alterar a função dos neurônios colinérgicos.

Entretanto, existe pouca informação acerca da interação dopamina-acetilcolina após o tratamento com drogas colinérgicas. Cubeddu *et al.*, (1991) e Raiteri *et al.*,(1990) demonstraram que o carbacol, um agonista de receptores muscarínicos aumenta a liberação de dopamina no córtex pré-frontal e no corpo estriado, sendo que uma maior facilitação da liberação de dopamina foi vista nos terminais dopaminérgicos do córtex pré-frontal. Em ambas as regiões cerebrais, a atropina (0,1 μ M) bloqueou o aumento da liberação de dopamina induzido pelo carbacol.

Posteriormente foi demonstrado que esse aumento da liberação de dopamina promovido pelo carbacol poderia ter sido mediado via ativação da PKC (proteína cinase C), sugerindo que a facilitação da transmissão dopaminérgica induzida pelo carbacol poderia ocorrer através da estimulação da proteína cinase C (Cubeddu *et al.*, 1991).

Hoffman *et al.*, (1996) mostraram que os efeitos dos agonistas muscarínicos sobre a liberação de dopamina e acetilcolina eram

dependentes do subtipo de receptor ativado. Assim eles demonstraram que o receptor muscarínico M2 inibe a liberação de dopamina, enquanto a estimulação do receptor M1 facilita a liberação de dopamina em corpo estriado de rato.

OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos de um agonista (carbacol) e um antagonista muscarínico (atropina) e sua associação com um agonista (mazindol) e antagonistas (pimozida e sulpirida) dopaminérgicos sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos em corpo estriado de rato.

RESULTADOS

A **Tabela 1** mostra que houve um aumento dos receptores M1 + M2-símile nos animais tratados com mazindol ($589,5 \pm 37,50$ fmol/mg de proteína) quando comparado ao grupo controle ($430,0 \pm 18,05$ fmol/mg de proteína). Da mesma maneira atropina 5 mg/kg, v.o. promoveu um aumento de 31 % na densidade destes receptores ($563,1 \pm 37,00$ fmol/mg de proteína). Este aumento, embora menor (em torno de 24 %) persistiu na associação de atropina + mazindol ($531,5 \pm 32,07$ fmol/mg de proteína).

O tratamento com carbacol 5 mg/kg, v.o. não alterou significativamente a densidade de receptores M1 + M2-símile ($440,4 \pm 36,92$ fmol/mg de proteína). Pimozida 20 mg/kg, v.o., apresentou uma tendência em aumentar (15 %) estes receptores ($493,5 \pm 26,85$ fmol/mg de proteína). Similarmente, quando administrados em associação (pimozida + carbacol), nenhuma alteração significativa foi observada ($476,3 \pm 31,26$ fmol/mg de proteína). A sulpirida 100 mg/kg, v.o. teve uma tendência a aumentar significativamente a densidade de M1 + M2 ($515,7 \pm 34,02$ fmol/mg de proteína) e quando administrado 30 minutos antes da atropina, bloqueou o aumento observado com esta droga isoladamente ($383,3 \pm 17,74$ fmol/mg de proteína), mas não promoveu nenhum efeito significativo quando combinado com o carbacol ($402,7 \pm 17,78$ fmol/mg de proteína) (**Tabela 1**).

O carbacol na dose de 20 mg/kg causou uma diminuição de 15 % ($367,2 \pm 36,67$ fmol/mg de proteína) na densidade de M1 + M2-símile, enquanto que na dose de 10 mg/kg, não produziu alteração significativa ($420,1 \pm 46,24$ fmol/mg de proteína). A atropina nas doses de 10 e 20

mg/kg não produziu alterações significativas ($531,9 \pm 60,22$ e $529,6 \pm 48,60$ fmol/mg de proteína, respectivamente) (**Figura 1**).

Tabela 1 - Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos e sua associação sobre os receptores muscarínicos (M1 + M2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-NMS (M1 + M2)
Controle	430,5 ± 18,05 (50)
maz 10	589,5 ± 37,50 (28) a
atr 5	563,1 ± 37,00 (06) a
atr 5 + maz 10	531,5 ± 32,07 (07) a
cbc 5	440,4 ± 36,92 (07)
pim 20	493,5 ± 26,85 (24)
pim 20 + cbc 5	476,3 ± 31,26 (07)
sul 100	515,7 ± 34,02 (14) a
sul 100 + cbc 5	402,7 ± 17,78 (10)
sul 100 + atr 5	383,3 ± 17,74 (11) b

Os animais foram tratados durante 7 dias com mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz 10) atropina 5 mg/kg, v.o., (atr 5), carbacol 5 mg/kg, v.o., (cbc 5), pimozida 20 mg/kg, v.o., (pim 20) e sulpirida 100 mg/kg, v.o., (sul 100). No caso das associações, atropina, pimozida ou sulpirida foram administrados 30 minutos antes da administração da segunda droga. Os animais foram sacrificados 24 h após a última injeção. Os valores representam média ± EPM do nº de experimentos em parênteses. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. **a** e **b** quando comparados ao controle e atropina, respectivamente ($p < 0,05$).

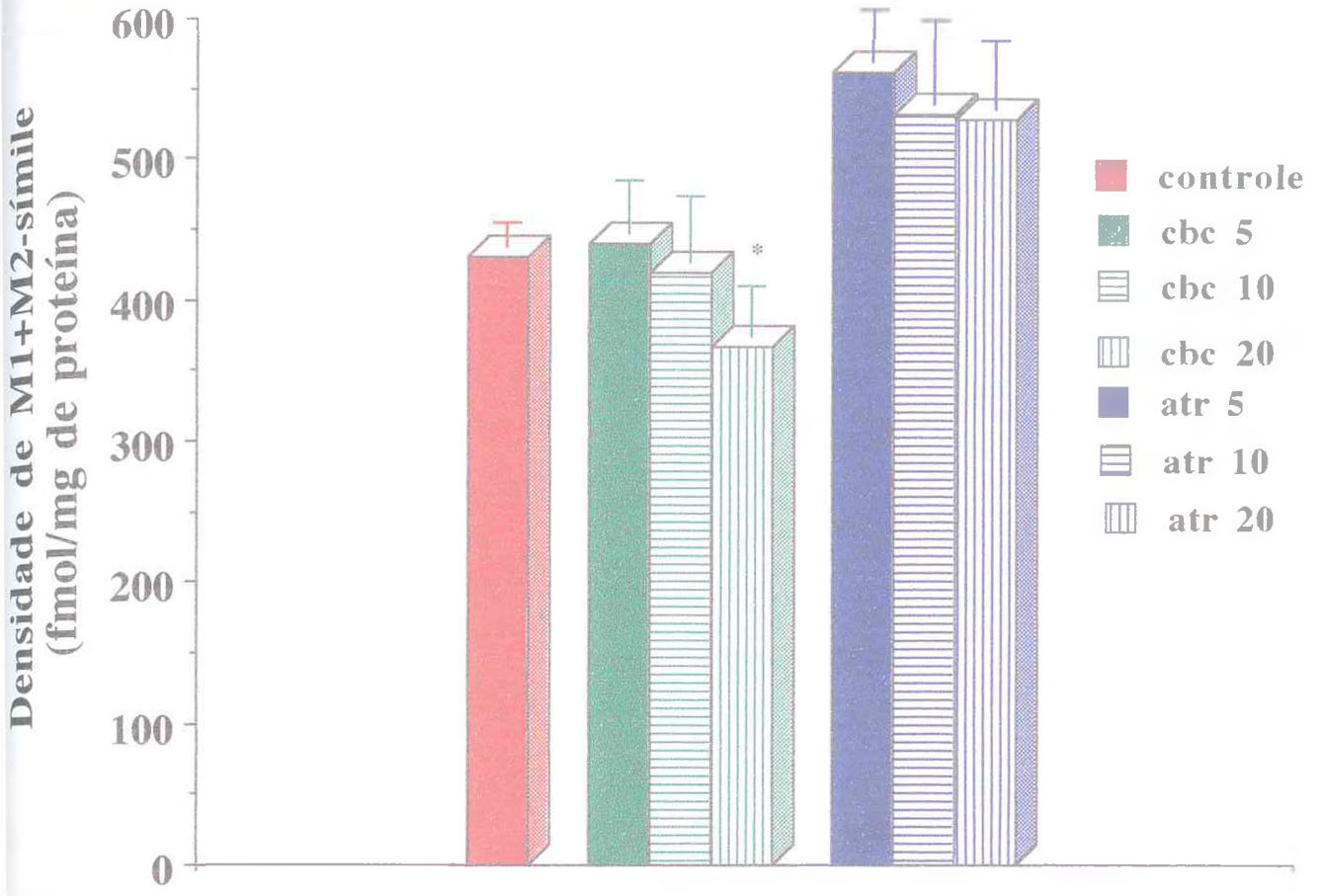


Figura 1 - Efeito do carbacol e atropina em diferentes doses sobre o *binding* de 3H-NMS em corpo estriado de rato. Os animais foram tratados durante 7 dias com atropina 5, 10 e 20 mg/kg, v.o., (atr 5, 10 e 20) e carbacol 5, 10 e 20 mg/kg, v.o., (cbc 5, 10 e 20). Os animais foram sacrificados 24 h após a última injeção. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

A **Tabela 2** mostra que a atropina isoladamente aumentou em torno de 37 % a densidade de receptores D1-símile ($224,0 \pm 23,86$ fmol/mg de proteína) quando comparado ao controle ($163,2 \pm 14,50$ fmol/mg de proteína). Entretanto, quando esta droga foi associada ao mazindol ($186,9 \pm 10,10$ fmol/mg de proteína), bloqueou o aumento ocorrido com o mazindol sozinho ($261,0 \pm 19,48$ fmol/mg de proteína), não havendo mais diferença entre o controle e a associação das duas drogas. O carbacol aumentou em 40 % a densidade de D1-símile ($226,4 \pm 19,48$ fmol/mg de proteína). Este efeito foi bloqueado pela sulpirida ($134,0 \pm 13,50$ fmol/mg de proteína), mas não o foi pela pimozida, ocorrendo, diferentemente, um aumento ($291,3 \pm 8,02$ fmol/mg de proteína) em relação ao carbacol sozinho. Estas duas drogas (pimozida e sulpirida) quando administradas isoladamente, produziram, respectivamente, um aumento ($291,3 \pm 8,02$ fmol/mg de proteína) e nenhuma alteração ($142,9 \pm 9,95$ fmol/mg de proteína) na densidade de receptores D1-símile. Na associação de atropina com sulpirida ($141,7 \pm 11,94$ fmol/mg de proteína) houve uma diminuição quando comparado com a atropina sozinha.

Sobre a densidade de receptores D2-símile (**Tabela 3**) foi verificado que mazindol produziu um aumento de 15 % ($261,6 \pm 13,63$ fmol/mg de proteína), enquanto os antagonistas dopaminérgicos, pimozida e sulpirida não produziram alterações significativas ($230,4 \pm 15,12$ e $247,6 \pm 14,65$ fmol/mg de proteína). Atropina causou um aumento de 25 % ($284,7 \pm 37,29$) em relação ao controle ($228,4 \pm 9,94$ fmol/mg de proteína), enquanto que o carbacol foi desprovido de efeito ($239,1 \pm 36,97$). Pimozida + carbacol ($229,8 \pm 31,44$ fmol/mg de proteína), atropina + mazindol ($225,0 \pm 27,12$ fmol/mg de proteína), sulpirida + carbacol ($221,1 \pm 12,35$ fmol/mg de proteína), ou sulpirida

+ atropina ($276,4 \pm 16,45$ fmol/mg de proteína) não causaram nenhum efeito nos receptores D2-símile.

A **Figura 2** mostra que o carbacol e a atropina em doses maiores (10 e 20 mg/kg, v.o.) aumentaram significativamente o número de receptores D2-símile ($351,7 \pm 20,27$ e $304,2 \pm 39,50$ fmol/mg de proteína para carbacol 10 e 20 mg/kg, respectivamente, e $373,4 \pm 40,30$ e $379,8 \pm 39,50$ fmol/mg de proteína para atropina 10 e 20 mg/kg, respectivamente).

A atropina na concentração de $100 \mu\text{M}$ (**Figura 3**), compete pelo *binding* de 3H-SCH 23390 e de 3H-espiroperidol ($73,2 \pm 5,42$ e $184,7 \pm 10,29$ fmol/mg de proteína, respectivamente) *in vitro* quando comparados aos respectivos controles ($112,4 \pm 12,10$ e $273,9 \pm 17,16$ fmol/mg de proteína, para 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol, respectivamente). Contudo, o carbacol na mesma concentração não competiu pelo *binding* destes ligantes antagonistas dopaminérgicos .

Tabela 2 - Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos e sua associação sobre os receptores dopaminérgicos (D1-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-SCH 23390 (D1-símile)
Controle	163,2 ± 14,50 (13)
maz 10	261,0 ± 16,89 (06)a
atr 5	224,0 ± 23,86 (06)a
atr 5 + maz 10	186,9 ± 10,10 (06)
cbc 5	226,4 ± 19,48 (05)a
pim 20	231,6 ± 13,43 (06)a
pim 20 + cbc 5	291,3 ± 8,02 (05)a,c
sul 100	142,9 ± 9,95 (06)
sul 100 + cbc 5	134,0 ± 13,50 (06)c
sul 100 + atr 5	141,7 ± 11,94 (05)b

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz 10), atropina 5 mg/kg, v.o., (atr 5), carbacol 5 mg/kg, v.o., (cbc 5), pimozida 20 mg/kg, v.o., (pim 20) e sulpirida 100 mg/kg, v.o., (sul 100). No caso das associações, atropina, pimozida ou sulpirida foram administrados 30 minutos antes da administração da outra droga. Os animais foram sacrificados 24 h após a última injeção. Os valores em fmol/mg de proteína representam média ± EPM do n° de experimentos em parênteses. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. **a**, **b** e **c**, quando comparado ao controle, atropina e carbacol, respectivamente ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos e sua associação sobre os receptores dopaminérgicos (D2-símile) em corpo estriado de rato

Grupo	3H-espiroperidol (D2-símile)
Controle	228,4 ± 9,94 (68)
maz 10	261,6 ± 13,63 (06) ^a
atr 5	247,2 ± 28,89 (08) ^a
atr 5 + maz 10	225,0 ± 27,12 (06)
cbc 5	239,1 ± 36,97 (07)
pim 20	230,4 ± 15,12 (31)
pim 20 + cbc 5	229,8 ± 31,44 (05)
sul 100	247,6 ± 14,65 (19)
sul 100 + cbc 5	221,1 ± 12,35 (11)
sul 100 + atr 5	276,4 ± 16,45 (11)

Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com mazindol 10 mg/kg, v.o., (maz 10), atropina 5 mg/kg, v.o., (atr 5), carbacol 5 mg/kg, v.o., (cbc 5), pimizida 20 mg/kg, v.o., (pim 20) e sulpirida 100 mg/kg, v.o., (sul 100). No caso das associações, atropina, pimizida ou sulpirida foram administrados 30 minutos antes da administração da segunda droga. Os animais foram sacrificados 24 h após a última injeção. Os valores em fmol/mg de proteína representam média ± EPM do nº de experimentos em parênteses. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. ^a quando comparado ao controle (p<0,05).

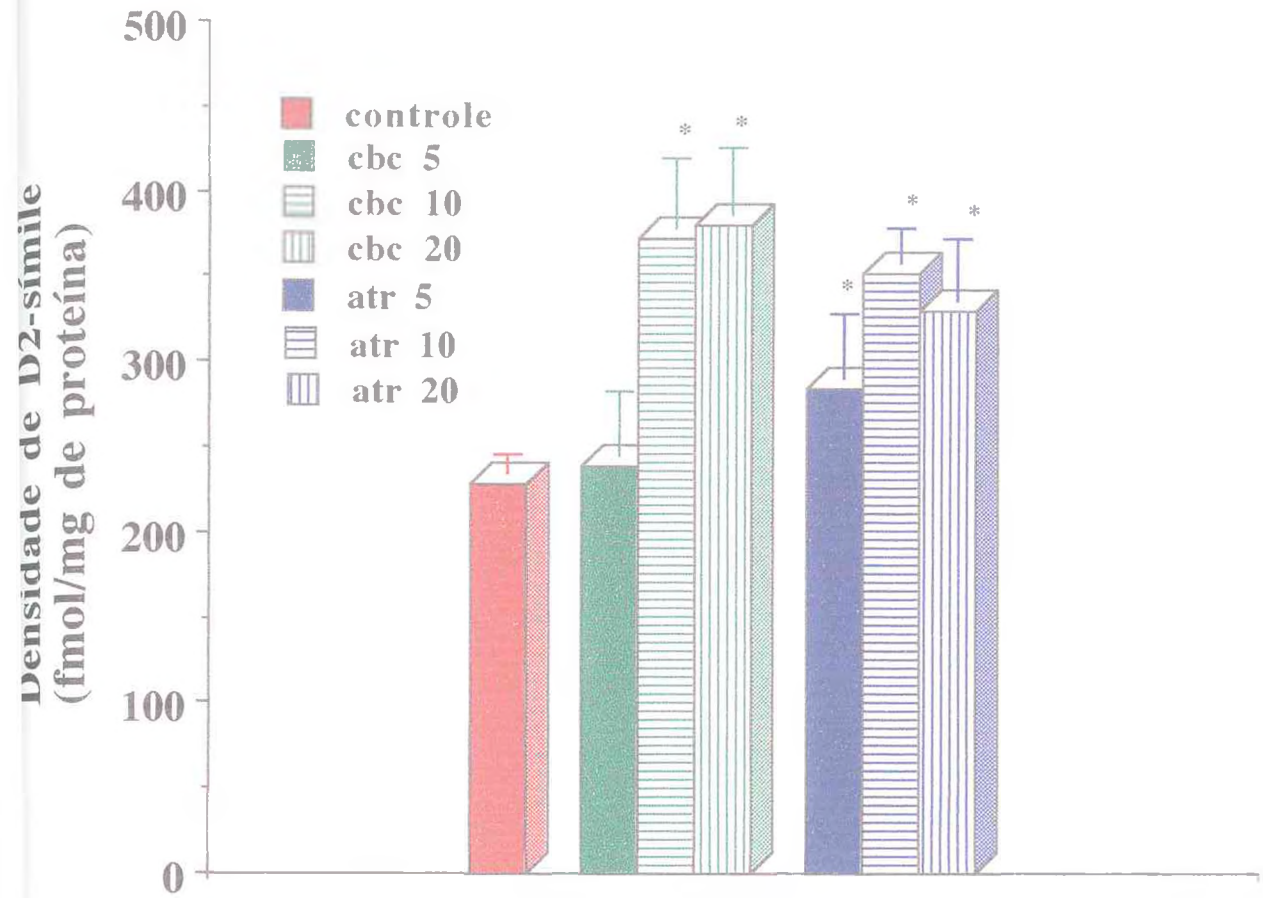


Figura 2 - Efeito do carbacol e atropina em diferentes doses sobre o *binding* de 3H-espiroperidol em corpo estriado de rato. Os animais foram tratados diariamente durante 7 dias com atropina 5, 10 e 20 mg/kg, v.o., (atr 5, 10 e 20) e carbacol 5, 10 e 20 mg/kg, v.o., (cbc 5, 10 e 20). Os animais foram sacrificados 24 h após a última injeção. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

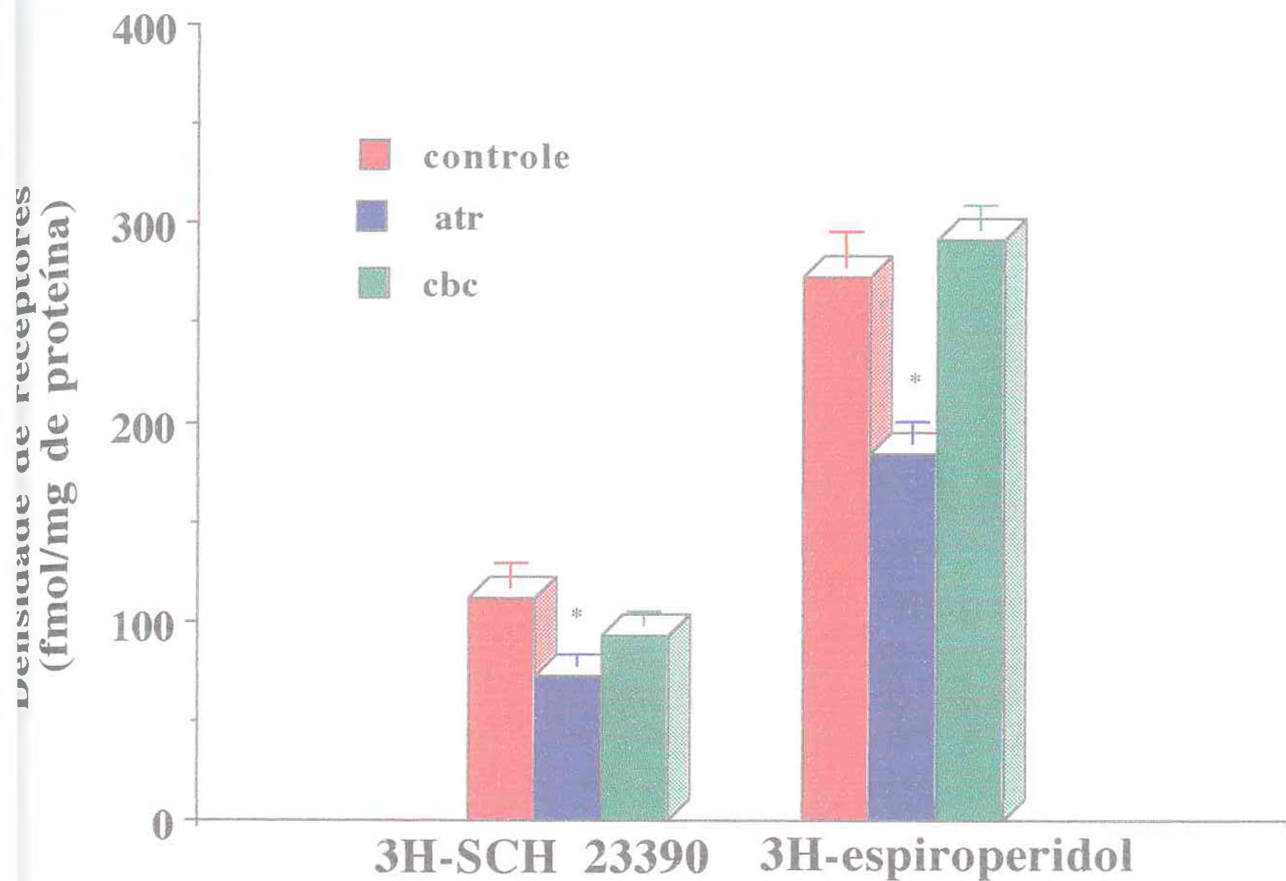


Figura 3 - Efeito do carbaccol e atropina sobre o *binding* de 3H-SCH 23390 e 3H-espiperidol em corpo estriado de rato. Os ligantes (3H-SCH 23390 e 3H-espiperidol) foram incubados por 60 minutos no tampão contendo carbaccol e atropina 100 μ M (cbc e atr, respectivamente) antes da filtração e os ensaios em duplicata foram executados como descrito na Tabela 1. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

DISCUSSÃO

A administração crônica de antagonistas muscarínicos causa *upregulation* dos receptores muscarínicos (Ben-Barak & Dudai, 1980; Berstein & Haga, 1990; Hadcok & Malbon, 1991; Hata *et al.*, 1980; Haganir & Greengard, 1990). Vários exemplos podem ser citados; entre eles a *upregulation* de receptores muscarínicos induzida pelo uso de antidepressivos e escopolamina que têm propriedades antimuscarínicas (Ben-Barak & Dudai, 1980; Majocha & Baldessarini, 1984).

A *upregulation* dos receptores muscarínicos observada no presente trabalho após o tratamento crônico com atropina corrobora os dados apresentados na literatura, confirmando o conceito de que a densidade dos receptores neuronais é aumentada quando sua interação com o neurotransmissor é reduzida (Porceddu *et al.*, 1986). Provavelmente, a acetilcolina liberada pré-sinápticamente não interagiu com os receptores. É relevante também sugerir que a dose administrada de atropina foi efetiva.

Por outro lado, sabe-se que o tratamento com agonistas muscarínicos causa *dowregulation* de receptores muscarínicos em várias estruturas (Berstein & Haga, 1990; Hadcock & Malbon, 1991; Haganir & Greengard, 1990). Agonistas colinérgicos muscarínicos diminuem a liberação de 3H-acetilcolina induzida por despolarização, e este fato é atribuído à ativação de receptores muscarínicos pré-sinápticos (James & Cubeddu, 1983; Marcli *et al.*, 1982). A diminuição da liberação de acetilcolina conduz a uma diminuição na densidade destes receptores. Entretanto, no presente trabalho, o carbacol não alterou o número de receptores muscarínicos. É possível que a dose utilizada não tenha sido

suficiente para induzir tal alteração. De fato, com doses maiores (20 mg/kg), o carbacol induziu uma *downregulation* de M1 + M2 .

O aumento dos receptores D1-símile provocado pelo carbacol, sugere uma influência muscarínica na regulação dopaminérgica a nível estriatal. Hoffman *et al.*, (1996) também demonstraram que o carbacol aumentou a liberação de dopamina em córtex pré-frontal e corpo estriado e que este efeito foi bloqueado pela atropina. Entretanto, no presente trabalho, o carbacol em concentrações micromolares, mostrou uma tendência a competir pelo *binding* do 3H-SCH 23390, sugerindo que esta droga interage com receptores D1-símile, o que poderia ter levado ao aumento destes receptores. De fato, na presença da pimozida, comprovadamente um antagonista D2, o aumento observado persistiu, confirmando a interação a nível de D1. Contudo, a sulpirida, também um antagonista D2, bloqueou o aumento observado com o carbacol sozinho, sugerindo diferentes papéis destes dois antagonistas.

A literatura mostra que a escopolamina, um antagonista muscarínico, potencia a liberação de dopamina no núcleo *accumbens*. Provavelmente este efeito ocorre porque a escopolamina inibe os heteroreceptores muscarínicos pré-sinápticos que modulam a liberação de outros neurotransmissores, além da acetilcolina, tais como a dopamina (Durkin *et al.*, 1983; Majocho & Baldessarini, 1984; Raiteri *et al.*, 1990).

Boyson *et al.*, (1988) mostraram que a atropina 20 mg/kg não alterou significativamente a densidade de receptores D2, mas causou um aumento significativo na densidade de receptores muscarínicos em corpo estriado de rato. Além disso, estes autores demonstraram que em concentrações micromolares e nanomolares, a atropina interagiu com

receptores dopaminérgicos e muscarínicos, respectivamente. Na presente investigação, usando atropina 5 mg/kg, v.o., foi encontrado um pequeno aumento em D2, aumento em M1 + M2 e adicionalmente também um aumento de 37 % em D1. Entretanto, na dose de 20 mg/kg a atropina causou um aumento de 45 % na densidade de D2-símile. O fato observado da atropina em concentrações micromolares (100 μ M) inibir o *binding* de 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol, sugere que ela interage com receptores dopaminérgicos, no caso, D1 e D2-símile, demonstrando uma atividade antagonista que pode ter induzido a *upregulation* ocorrida nos receptores dopaminérgicos no grupo tratado pela atropina.

Boyson *et al.*, (1988) verificaram que a co-administração de flufenazina, um neuroléptico, com a atropina atenuava o aumento observado no *binding* do 3H-QNB com atropina. Semelhantemente, no presente trabalho, a sulpirida, também um neuroléptico, bloqueou o aumento no *binding* de 3H-NMS observado com a atropina sozinha.

Antagonistas D2-seletivos promovem diminuições dose-dependente no conteúdo de acetilcolina no corpo estriado (Consolo *et al.*, 1981; Scatton, 1982a) e produzem aumento na liberação de acetilcolina estriatal *in vivo* (Damsma *et al.*, 1990a; Imperato *et al.*, 1993). Como a atropina causou uma *upregulation* que não foi observada na presença da sulpirida, conclui-se de maneira clara que a sulpirida interferiu nos efeitos muscarínicos da atropina. Este efeito pode também estar envolvido no caso dos receptores D2-símile pois a sulpirida não competiu pelo *binding* de 3H-NMS, mas a atropina na concentração de 100 μ M competiu pelo *binding* do 3H-espiroperidol. Contudo, uma interação com os receptores D1-símile também não pode ser descartada, considerando que a atropina também competiu pelo *binding* de 3H-SCH 23390.

A atropina e mazindol quando associados continuaram causando um aumento nos receptores M1 + M2-símile observado com ambas as drogas isoladamente. De fato no PROTOCOLO II já havia sido observado que o mazindol também competia pelo *binding* de 3H-NMS. Do mesmo modo que resultados anteriores, estes dados corroboram a interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico e sugerem que as drogas de ambos os sistemas podem interagir de forma sinérgica ou antagônica. A atropina um antagonista muscarínico agiu de forma sinérgica com o mazindol, um agonista dopaminérgico, sobre a densidade de receptores muscarínicos, enquanto que a sulpirida, um antagonista dopaminérgico, bloqueou os efeitos da atropina sobre os receptores muscarínicos.

CONCLUSÕES

- A atropina, antagonista muscarínico, causou uma *upregulation* dos receptores D1 e também competiu pelo *binding* de 3H-SCH 23390. Isto indica que seu efeito pode ter sido mediado via interação com os receptores D1-símile. Entretanto, os receptores D2 não podem ser descartados, considerando que a sulpirida bloqueou este efeito.

- O aumento dos receptores D1-símile induzido pelo carbacol indica uma influência muscarínica na regulação dopaminérgica a nível estriatal. Entretanto, não se pode descartar a hipótese deste aumento de D1-símile ser devido a interação do carbacol com estes receptores, pois esta droga competiu pelo *binding* do 3H-SCH 23390.

PROTOCOLO V

**Efeito da cocaína sobre os receptores muscarínicos e
dopaminérgicos em corpo estriado de rato**

INTRODUÇÃO

A cocaína é um poderoso estimulante psicomotor cujo uso compulsivo, não médico, tem aumentado grandemente durante a última década. Os efeitos farmacológicos da cocaína, resultam primariamente do bloqueio da recaptção de dopamina, norepinefrina e serotonina (Johanson & Schuster, 1995). A cocaína aumenta a concentração sináptica de dopamina na sinapse e assim age como um agonista dopaminérgico indireto (Lim *et al.*, 1990).

Evidências mostram que a síntese e a liberação de dopamina são reguladas por receptores dopaminérgicos, particularmente receptores D2 (Drukarch & Stoof, 1990; Kalsner & Westfall, 1990). Alguns estudos indicam que após o tratamento crônico com cocaína ocorre um aumento da liberação de dopamina (Kalivas & Duffy, 1990; Pettit *et al.*, 1990) que requer a ativação do receptor dopaminérgico (Peris & Zahniser, 1989). Também tem sido observado alterações na recaptção de dopamina após o tratamento crônico com cocaína (Ng *et al.*, 1991; Parson *et al.*, 1991), podendo ser hipotetizado que junto com a síntese e a liberação, a captação de dopamina também está sob a regulação do receptor dopaminérgico.

A administração de cocaína altera as características de *binding* dos receptores dopaminérgicos, embora muitos dos resultados sejam contraditórios. Alguns estudos mostram que a administração aguda de cocaína aumenta (Memo *et al.*, 1981) ou tem efeitos mínimos (Dwoskin *et al.*, 1988) sobre a densidade de receptores dopaminérgicos em múltiplos tecidos. Efeitos diferentes sobre o número de receptores dopaminérgicos estriatais também foram observados após o tratamento sub-agudo com cocaína (Lim *et al.*, 1990).

Alguns estudos sugerem o envolvimento dos receptores D1 e D2 nos efeitos da cocaína em causar dependência. Os primeiros trabalhos de autoadministração (Johanson & Fischman, 1989) usando agonistas e antagonistas dopaminérgicos sugeriam um papel proeminente dos receptores D2 pós-sinápticos (Wooverton & Virus, 1989). Outros trabalhos demonstraram que o SCH 23390, um antagonista relativamente específico de receptores D1-símile bloqueou os efeitos causadores de dependência da cocaína em ratos (Koob *et al.*, 1987; Maldonado *et al.*, 1993). Wooverton *et al.*, (1986) mostraram que o SCH 23390 não afetou a autoadministração de cocaína em macacos *rhesus*. Além do mais, alguns estudos em ratos verificaram que tanto antagonistas D1 quanto D2 especificamente diminuem os efeitos da cocaína relacionados com a dependência, sugerindo que ambos os subtipos de receptores são importantes neste fenômeno (Hubner & Moreton, 1991; Roberts *et al.*, 1989). Assim, no presente momento, as interações entre os vários receptores dopaminérgicos e a dependência causada pela cocaína não foram ainda completamente delineados.

Indubitavelmente, os receptores dopaminérgicos e possivelmente outros (Cunningham & Callahan, 1991; Koob & Bloom, 1988; Mello *et al.*, 1989; Pulvirenti *et al.*, 1992; Schenk *et al.*, 1993), incluindo receptores muscarínicos (Tan & Costa, 1994), desempenham algum papel na dependência e em outros efeitos causados pela cocaína.

OBJETIVOS

Considerando que a cocaína inibe a recaptação de dopamina, aumentando conseqüentemente os níveis extracelulares de dopamina e sabendo que a dopamina pode influenciar tanto o sistema dopaminérgico como o colinérgico, o objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos da administração crônica de cocaína sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos a fim de elucidar as ações da cocaína sobre estes dois sistemas de neurotransmissores.

RESULTADOS

A **Tabela 1** mostra que a administração diária durante 1 semana de cocaína (5, 10 e 50 mg/kg, i.p.) causou aumentos de 25,7 (664,4 ± 40,12 fmol/mg de proteína); 34,3 (709,8 ± 35,46 fmol/mg de proteína) e 48,6 % (785,4 ± 37,40 fmol/mg de proteína), respectivamente, sobre os receptores M1 + M2-símile. Aumentos menores, mas também significativos de 27 (366,9 ± 40,52 fmol/mg de proteína) e 41 % (407,9 ± 19,40 fmol/mg de proteína) foram observados nos receptores M1-símile após o tratamento com cocaína 5 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente. Com a maior dose de cocaína (50 mg/kg, i.p.) foi detectado um efeito menor de apenas 18 % (339,4 ± 35,87 fmol/mg de proteína). A administração diária de cocaína (5 e 10 mg/kg, i.p.) produziu aumentos (dose-dependente) de 30 (46,0 ± 2,64 fmol/mg de proteína) e 84 % (65,3 ± 5,87 fmol/mg de proteína) sobre os receptores do subtipo M2 quando comparados ao grupo controle (35,3 ± 1,26 fmol/mg de proteína). O efeito diminuiu drasticamente com um aumento de apenas 17 %, (41,5 ± 1,48 fmol/mg de proteína) após a administração de cocaína na dose de 50 mg/kg, i.p. (**Tabela 2**).

Os efeitos da administração de cocaína sobre os receptores D1 e D2-símile são apresentados na **Tabela 3**. Não foram encontradas alterações significativas nos receptores D1-símile com a menor dose de cocaína, 5 mg/kg, i.p. (145,1 ± 15,90 fmol/mg de proteína) quando comparado ao controle (168,7 ± 16,69 fmol/mg de proteína). Em maiores doses (10 e 50 mg/kg, i.p.) houve aumentos similares em torno de 32 % (221,3 ± 24,36 e 223,1 ± 23,11 fmol/mg de proteína, respectivamente). Com relação aos receptores D2-símile foram observados aumentos de 63 (393,5 ± 23,96 fmol/mg de proteína) e 54 %

(372,5 ± 8,15 fmol/mg de proteína) com as doses de 5 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente, quando comparados ao controle (241,9 ± 10, fmol/mg de proteína). Um aumento muito maior (109 %) foi observado nestes receptores com a dose de 50 mg/kg, i.p. (507,4 ± 33,77 fmol/mg de proteína).

A **Tabela 4** mostra os efeitos da cocaína diretamente sobre o *binding* de 3H-NMS, 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol (experimento *in vitro*). Nas doses de 12,5 e 25 µM a cocaína diminuiu o *binding* de 3H-NMS em torno de 60 % (153,7 ± 14,45 e 183,2 ± 23,40 fmol/mg de proteína, respectivamente) quando comparado ao controle (456,5 ± 47,10 fmol/mg de proteína). Com as doses de 50 e 100 µM as percentagens de inibição do *binding* de 3H-NMS subiram para 70 % (109,4 ± 8,96 e 130,2 ± 16,60 fmol/mg de proteína, respectivamente). Enquanto nenhum efeito foi detectado no *binding* de 3H-SCH 23390 ou 3H-espiroperidol após incubação dos homogenatos com cocaína 100 µM, uma inibição em torno de 70 % foi demonstrado no *binding* de 3H-espiroperidol na presença de cocaína 12,5 µM (dados não mostrados) no *binding* do 3H-espiroperidol. Esta percentagem de inibição não variou com o aumento das doses até 100 µM. Nesta dose observou-se uma inibição em torno de 50 % no *binding* do 3H-espiroperidol (118,2 ± 18,70 fmol/mg de proteína).

A **Tabela 5** apresenta os efeitos da cocaína sobre os valores de Bmax e Kd utilizando 3H-NMS, 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol como ligantes muscarínicos (M1 + M2), D1 e D2, respectivamente. No caso dos receptores M1 + M2 símile foram detectados aumentos de 52 e 57 % nos valores de Bmax (cocaína 5= 776,9 ± 76,30 fmol/mg de proteína; cocaína 50= 802,5 ± 37,27 fmol/mg de proteína, respectivamente) quando comparados ao controle (511,4 ± 32,67

fmol/mg de proteína). Aumentos maiores do que 100 % foram obtidos nos valores de Kd com cocaína 5 e 10 mg/kg, i.p., ($1,67 \pm 0,62$ e $1,59 \pm 0,09$ nM, respectivamente). Nenhuma alteração ocorreu na densidade de receptores D1-símile na presença de cocaína nas doses de 5 e 50 mg/kg, i.p. ($146,6 \pm 25,81$ e $198,4 \pm 37,74$ fmol/mg de proteína) quando comparado ao controle ($216,0 \pm 21,68$ fmol/mg de proteína). Entretanto, uma diminuição dose-dependente, ocorreu em ambas as doses nos valores de Kd ($1,78 \pm 0,57$ e $0,86 \pm 0,17$ nM para os grupos tratados com cocaína 5 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente), quando comparados ao grupo controle ($2,40 \pm 0,39$ nM). Similarmente ao que aconteceu no caso dos receptores M1 + M2-símile, houve um aumento dose-dependente nos valores de Bmax nos grupos tratados com cocaína 5 e 10 mg/kg., i.p. ($363,3 \pm 43,94$ e $518,7 \pm 45,71$ fmol/mg de proteína, respectivamente) quando comparado ao controle ($246,2 \pm 43,72$ fmol/mg de proteína). Efeitos maiores foram observados nos valores de Kd que aumentaram de $1,8 \pm 0,51$ nM no grupo controle para $8,5 \pm 1,46$ e $17,6 \pm 3,64$ nM nos grupos tratados com cocaína (5 e 10 mg/kg, i.p., respectivamente).

Tabela 1 - Efeito da cocaína sobre o *binding* de 3H-NMS (M1 + M2-símile) em corpo estriado de rato

Cocaína (mg/kg, i.p.)	3H-NMS <i>binding</i> (M1 + M2-símile)
0	528,4 ± 25,69 (11)
5	664,4 ± 40,12 (12)*
10	709,8 ± 35,46 (8)*
50	785,4 ± 37,40 (11)*

Os animais foram tratados diariamente por 1 semana com cocaína 5, 10 e 50 mg/kg, i.p., e decapitados 24 h após a última injeção. Os dados são expressos como média ± EPM do número de experimentos mostrados nos parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. *p < 0,05 quando comparado ao controle.

Tabela 2 - Efeito da cocaína sobre o *binding* de 3H-NMS (receptores M1 e M2-símile) em corpo estriado de rato

Cocaína (mg/kg, i.p.)	3H-NMS + cbc (M1-símile)	3H-NMS + PZ (M2-símile)
0	288,5 ± 17,45 (07)	35,5 ± 1,26 (06)
5	366,9 ± 40,52 (06)	46,0 ± 2,64 (06)
10	407,9 ± 19,40 (06)*	65,3 ± 5,87 (12)*
50	339,4 ± 35,87 (06)	41,5 ± 1,48 (06)

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Os dados em fmol/mg de proteína são expressos como média ± EPM do número de experimentos em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. *p < 0,05 quando comparado ao controle.

Tabela 3 - Efeito da cocaína sobre o *binding* de 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol em corpo estriado de rato

Cocaína (mg/kg, i.p.)	3H-SCH 23390 (D1-símile)	3H-espiroperidol (D2-símile)
0	168,7 ± 16,69 (13)	241,9 ± 10,03 (06)
5	145,1 ± 15,90 (9)	393,5 ± 23,96 (10)*
10	221,3 ± 24,36 (14)	72,5 ± 8,15 (06)*
50	223,1 ± 23,11 (7)	507,4 ± 33,77 (10)*

Os animais foram tratados diariamente por 1 semana com cocaína 5, 10 e 50 mg/kg, i.p.. Os resultados são expressos como média ± EPM do número de experimentos em parênteses. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. *p < 0,05 quando comparado ao controle.

Tabela 4 - Efeito da cocaína sobre o *binding* de 3H-NMS, 3H-SCH 23390 e 3H-espiroperidol em homogenatos de corpo estriado de rato (experimentos *in vitro*)

Cocaína (μM)	3H-NMS (M1 + M2 <i>símile</i>)	3H-SCH 23390 (D1- <i>símile</i>)	3H-espiroperidol (D2- <i>símile</i>)
0	456,5 \pm 47,10 (10)	147,6 \pm 14,60 (4)	253,3 \pm 26,63 (4)
12,5	153,7 \pm 14,45 (5)*	---	---
25	183,2 \pm 23,40 (7)*	---	---
50	109,4 \pm 8,96 (4)*	---	---
100	130,2 \pm 16,60 (6)*	26,8 \pm 10,34 (4)	118,2 \pm 18,70 (6)*

Os homogenatos foram incubados por 30 min com cocaína (μM), na presença de 3H-NMS, 3H-SCH 23390 (100 μM) ou 3H-espiroperidol (100 μM), ligantes específicos para receptores muscarínicos, D1 e D2-*símile*, respectivamente. Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Tabela 5 - Efeito da administração repetida de cocaína nos receptores muscarínicos e dopaminérgicos D1 e D2-símile sobre os valores de Bmax e Kd no corpo estriado de rato

COC	M1+M2-símile		D1-símile		D2-símile	
	Bmax	Kd	Bmax	Kd	Bmax	Kd
0	511,4±32,67(4)	0,76±0,24(4)	216,0±21,68(5)	2,40±0,39 (5)	246,2±43,72(4)	1,8±0,51(4)
5	776,9±76,30(4)*	1,67±0,62(4)	146,6±25,81(3)	1,78±0,57(4)	363,3±43,94(4)	8,5±1,46(4)
50	802,5±37,27(3)*	1,59±0,09(3)	198,4±37,74(3)	0,86±0,17(3)*	518,7±45,71(4)*	17,6±3,64(4)*

Os ensaios foram executados como descrito na Tabela 1. Para análise estatística, ANOVA e teste de Fisher *post hoc* foi usado. *p < 0,05 quando comparado ao controle.

DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou aumento significativo e dose-dependente dos receptores muscarínicos em corpo estriado de rato após o tratamento com cocaína. As alterações no Bmax ocorreram acompanhadas de aumentos maiores do que 100 % nos valores da constante de dissociação, sugerindo uma diminuição de afinidade do receptor na presença de cocaína. Este aumento (*upregulation*) detectado nos receptores M1 + M2-símile foi também verificado em M1 e M2-símile separadamente. Embora muitos dos efeitos da cocaína sejam associados à inibição da recaptação de monoaminas, e particularmente no caso da capacidade de induzir dependência, especificamente a inibição da recaptação de dopamina no cérebro (Ritz *et al.*, 1987), existem evidências de que a cocaína tem afinidade para receptores muscarínicos (Sharkey *et al.*, 1988).

Assim, Sharkey *et al.*, (1988) mostraram que a cocaína inibia o *binding* muscarínico no coração e no cérebro com uma maior afinidade para receptores M2 do que M1-símile. Trabalho mais recente (Lipton *et al.*, 1995) mostrou diminuição no *binding* muscarínico em corpo estriado de ratos tratados durante 3 a 5 dias, e em hipocampo de ratos tratados durante 5 e 21 dias após a última administração. Entretanto, 12 horas após a última administração de cocaína em um tratamento de 5 dias foi observado um aumento no *binding* do 3H-QNB no corpo estriado, o qual persistiu até 2 dias após o período de administração. Resultados similares foram observados em hipocampo.

Trabalhos anteriores (Karpen & Hess, 1986 e Sharkey *et al.*, 1988) mostraram que a cocaína pode diretamente antagonizar os receptores colinérgicos. Experimentos *in vitro* demonstraram que não

somente a cocaína, mas também seus metabólitos foram capazes de interagir com os receptores muscarínicos, inibindo o *binding* de 3H-telenzepina em córtex cerebral, de uma maneira dose-dependente. Portanto, nos estudos envolvendo mecanismo de ação da cocaína devem ser considerados parâmetros tais como a dose, a duração do tratamento e o tempo decorrido após a última injeção.

No presente trabalho todas as avaliações dos efeitos da cocaína foram determinadas 24 horas após a última injeção. Não foram observados alterações significativas nos receptores D1-símile, após o tratamento com cocaína. A ação predominante da droga sobre o sistema dopaminérgico foi detectada nos receptores D2-símile. Neste caso, efeitos similares aos ocorridos nos receptores M1 + M2-símile foram observados, tais como uma *upregulation* associada com um drástico aumento nos valores da constante de dissociação. Estes resultados são discordantes com àqueles obtidos por Alburges *et al.*, (1992) e também Alburges & Wamsley (1993) que mostraram um aumento significativo no número de receptores dopaminérgicos D1-símile e nenhuma alteração em D2-símile em córtex motor e corpo estriado de rato. Nestes experimentos os animais foram tratados durante 1, 3, 7, 14 e 21 dias e as medidas foram executadas 21 dias após a última injeção. Os autores consideraram que o aumento ocorrido no receptor D1-símile poderia indicar que este receptor se tornou dessensibilizado na presença de cocaína.

Similarmente ao presente trabalho, outros pesquisadores (Zeigler *et al.*, 1991) verificaram um aumento no *binding* da 3H-espiperona em núcleo caudado de ratos tratados com cocaína (20 mg/kg, s.c.) diariamente, 30 dias após a última injeção. Zahniser *et al.*, (1988) mostraram um aumento significativo de receptores D2-símile no SNC

após o tratamento crônico com cocaína. Por outro lado, Peris *et al.*, (1990) mediu os receptores D2 e D1-símile 1 dia após o tratamento com cocaína (10 mg/kg, i.p.) usando como ligantes 3H-espiroperidol e 3H-SCH 23390, respectivamente, durante 8 dias. Estes experimentos mostraram um aumento do *binding* do 3H-espiroperidol, e o núcleo *accumbens* foi a única área que apresentou um aumento de D2-símile. Por outro lado, os receptores D1-símile não foram alterados.

De acordo com estes autores, pelo menos dois mecanismos poderiam contribuir para um aumento transitório na responsividade do núcleo *accumbens* após o tratamento com a cocaína: o aumento na densidade de receptores D2-símile e a sensibilidade aumentada de agonistas dos receptores D2-símile nesta área. Goeders & Kuhar (1987) mostraram que a administração de cocaína durante 15 dias causou uma diminuição na densidade de receptores D2-símile no corpo estriado e um aumento na densidade destes receptores em núcleo *accumbens*, imediatamente após a última injeção de cocaína. Outros autores (Kleven *et al.*, 1990) mostraram que no núcleo *accumbens* os receptores D1-símile diminuíram, enquanto os D2-símile aumentaram imediatamente após a última injeção, o mesmo não ocorrendo 2 semanas após a última injeção de cocaína.

Em suma, as evidências indicam que a cocaína causa mudanças nos receptores dopaminérgicos no corpo estriado. Além disso, ela apresenta efeitos diferenciais, não somente qualitativos mas também quantitativos, sobre os receptores muscarínicos e dopaminérgicos pós-sinápticos, que podem variar em função da dose, duração do tratamento e período decorrido após a última injeção da droga.

CONCLUSÕES

- O efeito da cocaína sobre os receptores muscarínicos pode ter sido mediado tanto via receptores muscarínicos uma vez que esta droga competiu *in vitro* com o ligante 3H-NMS quanto por receptores dopaminérgicos, considerando que o mecanismo de ação da cocaína neste caso consiste em aumentar os níveis de dopamina através da inibição de receptores deste neurotransmissor.

- Os efeitos da cocaína sobre a densidade de receptores muscarínicos e dopaminérgicos podem variar em função da dose, duração do tratamento e intervalo entre o último tratamento e análise da densidade dos receptores.

PROTOCOLO VI

**Efeito de agonista e antagonista
muscarínico ou dopaminérgico
sobre os níveis de nucleotídeos cíclicos
(AMPc e GMPc)
em córtex motor e corpo estriado de rato**

INTRODUÇÃO

Sinais extracelulares tais como neurotransmissores, hormônios e fatores do crescimento controlam seus efeitos biológicos nas células se ligando a receptores específicos de membrana e ativando uma cascata de eventos sinalizadores dentro da célula. Estes mecanismos de transdução celular ainda não estão bem definidos.

As respostas fisiológicas destes sinais extracelulares são mediadas através de segundos mensageiros. Este é um termo descrito por Sutherland *et al.*, (1968) para moléculas que são capazes de transmitir intracelularmente, os efeitos biológicos de compostos que são incapazes de entrar nas células-alvo.

O AMPc, desde sua descoberta há 30 anos atrás, exerce um papel decisivo no entendimento da função dos segundos mensageiros nos sistemas de transdução do sinal de membrana (Cook *et al.*, 1957; Lipkin *et al.*, 1959; Sutherland *et al.*, 1968; Sutherland & Rall., 1957). Após a ligação da droga ao receptor, a enzima adenilil ciclase converte ATP em AMPc o qual exerce seus efeitos ativando uma proteína cinase capaz de fosforilar substratos específicos. A ativação ou inibição da adenilil ciclase pelos receptores de membrana nos mamíferos é feita através de proteína regulatórias - GTP (proteínas G) (Gilman, 1987; Levitzki, 1986). A informação química vem do receptor para a adenilil ciclase através de uma proteína G heterotrimérica.

O AMPc está envolvido com os sistemas nervoso (Drummond, 1983) e cardiovascular (Hamet, 1980), em mecanismos imunológicos (Plaut, 1980), crescimento e diferenciação celular (Boynton & Whitfield, 1983), bem como no metabolismo geral (Exton, 1980). A

medida dos níveis de AMPc intracelular é de considerável interesse para o entendimento dos processos fisiológicos e da patologia de muitas doenças.

Após a descoberta de que o AMPc atua como um importante regulador intracelular em muitos tecidos a pesquisa se voltou para o estudo de outros nucleotídeos cíclicos. O GMPc foi primeiro identificado por Ashman (1963) e desde essa época sabe-se que é largamente distribuído, ocorrendo na maioria dos tecidos animais. Os níveis de GMPc na maioria dos tecidos são muito baixos, sendo 1-10 % dos níveis do AMPc.

A administração de alguns compostos conhecidos afeta os níveis de AMPc e GMPc nos tecidos. Os maiores órgãos-alvo das fibras colinérgicas parassimpáticas contêm receptores muscarínicos que conduzem a um aumento no GMPc (Goldberg & Haddox, 1973). Os receptores muscarínicos dos gânglios simpáticos e do cérebro também induzem à síntese de GMPc.

Os receptores muscarínicos podem se acoplar negativamente à adenilil ciclase, ou seja, através da inibição da ativação desta enzima. Os subtipos M1, M3 e M5 se acoplam à hidrólise de fosfoinosítídeos, enquanto os subtipos M2 e M4 preferencialmente se acoplam à inibição da adenilil ciclase (Peralta *et al.*, 1988).

Os receptores dopaminérgicos exercem suas ações biológicas através do acoplamento e ativação de diferentes complexos de proteínas G. O receptor D1 interage com complexos G estimulatórios resultando na ativação da adenilil ciclase e um conseqüente aumento dos níveis de

AMPC intracelular, enquanto o receptor D2 interage com complexos inibitórios que inibem a produção de AMPC (Civelli *et al.*, 1993).

OBJETIVOS

Considerando que as drogas dopaminérgicas e muscarínicas exercem suas ações influenciando os níveis de nucleotídeos cíclicos, procurou-se verificar os efeitos da interação entre agonistas e antagonistas dopaminérgicos e muscarínicas sobre os níveis de AMPc e GMPc em córtex motor e corpo estriado de rato.

RESULTADOS

A **Figura 1** apresenta os efeitos de agonistas e antagonistas dopaminérgicos, isoladamente ou associados sobre os níveis de AMPc em córtex motor e corpo estriado de rato. Os resultados mostraram que o mazindol e a pimozida quando administrados isoladamente não promoveram alterações nos níveis de AMPc ($4,29 \pm 0,47$ e $3,20 \pm 0,46$ pmol/mg de proteína, respectivamente) em córtex motor de ratos, quando comparados ao controle ($3,96 \pm 0,38$ pmol/mg de proteína). Entretanto, quando associados houve um aumento significativo (44 %) dos níveis de AMPc ($4,61 \pm 0,50$ pmol/mg de proteína) com relação à pimozida sozinha. Em corpo estriado foi mostrado que o mazindol e a pimozida causaram um aumento não significativo de 15 ($2,28 \pm 0,13$ pmol/mg de proteína) e 18 % ($2,33 \pm 0,16$ pmol/mg de proteína), respectivamente quando comparados ao controle (pmol/mg de proteína). A associação de pimozida + mazindol não promoveu alteração significativa ($2,09 \pm 0,12$ pmol/mg de proteína).

A **Figura 2** mostra que em córtex motor, a atropina causou uma diminuição de 47 % dos níveis de AMPc ($2,1 \pm 0,27$ pmol/mg de proteína) quando comparado ao controle ($3,96 \pm 0,38$ pmol/mg de proteína), e quando associada (atropina + mazindol) diminuiu em 30 % ($3,0 \pm 0,45$ pmol/mg de proteína) o efeito observado com o mazindol sozinho ($4,29 \pm 0,47$ pmol/mg de proteína). O carbacol sozinho ($3,3 \pm 0,36$ pmol/mg de proteína) ou associado à pimozida (pimozida + carbacol) não produziu efeito significativo ($4,3 \pm 0,69$ pmol/mg de proteína). No corpo estriado (**Figura 3**) foi observado que tanto a atropina como o carbacol apresentaram uma tendência a um aumento de 26 % nos níveis de AMPc ($2,5 \pm 0,29$ e $2,5 \pm 0,20$ pmol/mg de proteína) em relação ao controle ($1,98 \pm 0,17$ pmol/mg de proteína). A

associação da pimozida + carbacol promoveu um aumento de 31 % nos níveis de AMPc ($2,6 \pm 0,30$ pmol/mg de proteína) quando comparado ao controle, enquanto que a associação de atropina + mazindol não promoveu nenhuma alteração significativa.

A **Figura 4** mostra que o mazindol ($0,205 \pm 0,04$ pmol/mg de proteína) e a pimozida sozinhos ($0,207 \pm 0,03$ pmol/mg de proteína), ou associados ($0,165 \pm 0,01$ pmol/mg de proteína) não promoveram alterações significativas nos níveis de GMPc quando comparados ao controle ($0,214 \pm 0,03$ pmol/mg de proteína) em córtex motor de ratos. Entretanto, no corpo estriado, o mazindol causou um aumento de 55 % nos níveis de GMPc ($0,208 \pm 0,004$ pmol/mg de proteína) aumento este que foi bloqueado pela pimozida ($0,143 \pm 0,020$ pmol/mg de proteína). Entretanto a pimozida sozinha não causou efeito significativo ($0,0116 \pm 0,0048$ pmol/mg de proteína) quando comparada ao controle ($0,134 \pm 0,0100$ pmol/mg de proteína).

associação da pimozida + carbacol promoveu um aumento de 31 % nos níveis de AMPc ($2,6 \pm 0,30$ pmol/mg de proteína) quando comparado ao controle, enquanto que a associação de atropina + mazindol não promoveu nenhuma alteração significativa.

A **Figura 4** mostra que o mazindol ($0,205 \pm 0,04$ pmol/mg de proteína) e a pimozida sozinhos ($0,207 \pm 0,03$ pmol/mg de proteína), ou associados ($0,165 \pm 0,01$ pmol/mg de proteína) não promoveram alterações significativas nos níveis de GMPc quando comparados ao controle ($0,214 \pm 0,03$ pmol/mg de proteína) em córtex motor de ratos. Entretanto, no corpo estriado, o mazindol causou um aumento de 55 % nos níveis de GMPc ($0,208 \pm 0,004$ pmol/mg de proteína) aumento este que foi bloqueado pela pimozida ($0,143 \pm 0,020$ pmol/mg de proteína). Entretanto a pimozida sozinha não causou efeito significativo ($0,0116 \pm 0,0048$ pmol/mg de proteína) quando comparada ao controle ($0,134 \pm 0,0100$ pmol/mg de proteína).

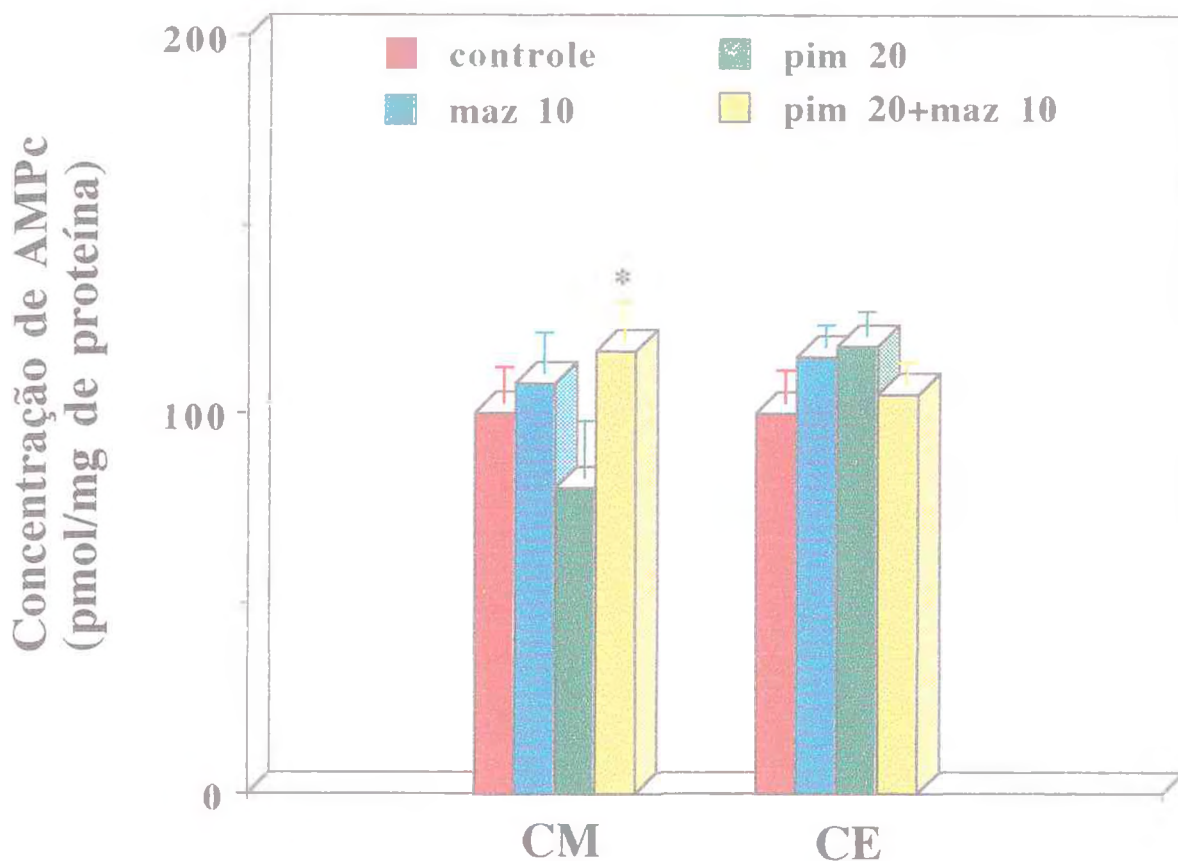


Figura 1 - Efeito da administração de mazindol e pimozida, sozinhos ou associados sobre os níveis de AMPc em córtex motor e corpo estriado de rato. Ratos Wistar (180 - 200 g) foram mortos por decapitação; as regiões cerebrais foram removidas e pesadas, e a concentração de AMPc foi medida como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Os experimentos foram realizados em duplicata, cada grupo com 6 a 10 animais. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado à pimozida.

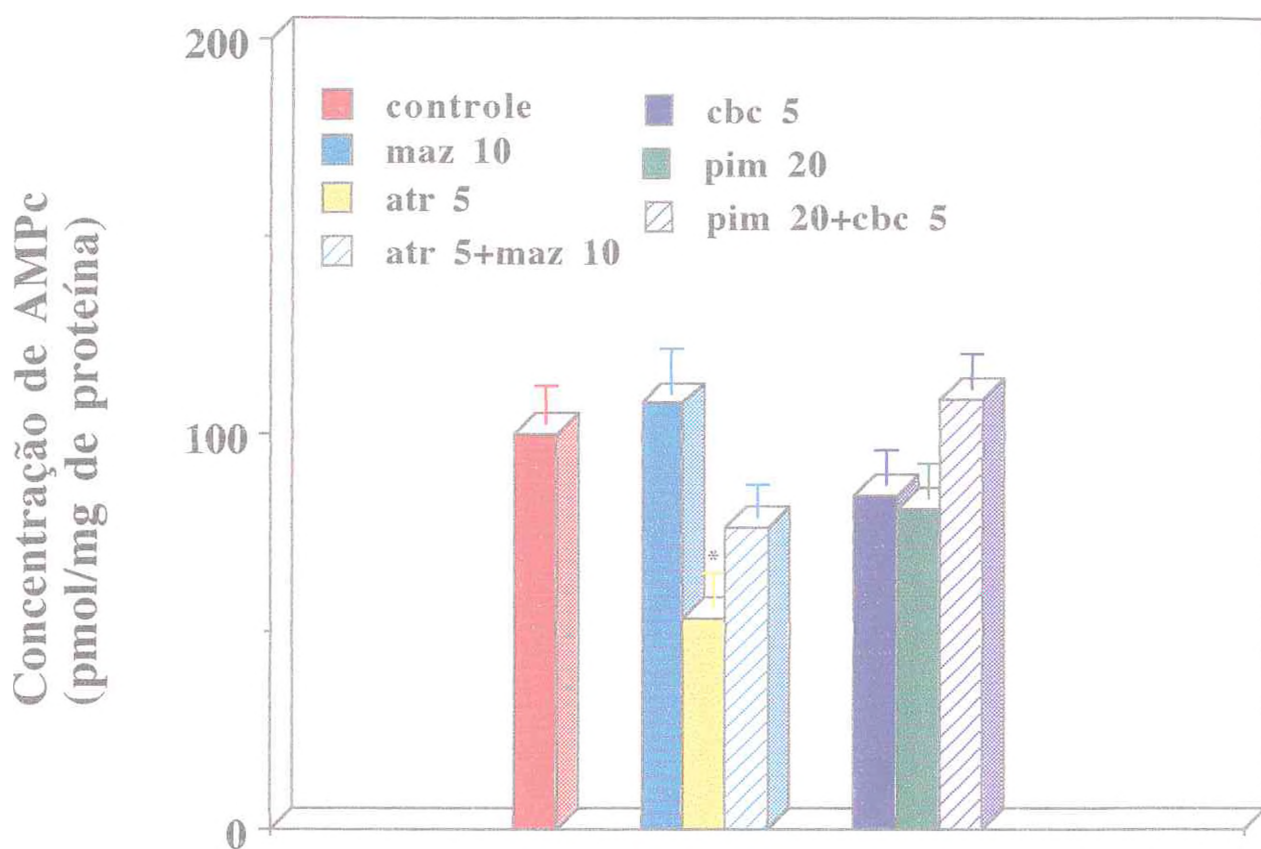


Figura 2 - Efeito da administração de carbacol e atropina, sozinhos ou associados com pimozida ou mazindol, respectivamente, sobre os níveis de AMPc em córtex motor de rato. Ratos Wistar (180 - 200 g) foram mortos por decapitação; as regiões cerebrais foram removidas e pesadas, e a concentração de AMPc foi medida como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Os experimentos foram realizados em duplicata, cada grupo com 6 a 10 animais. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

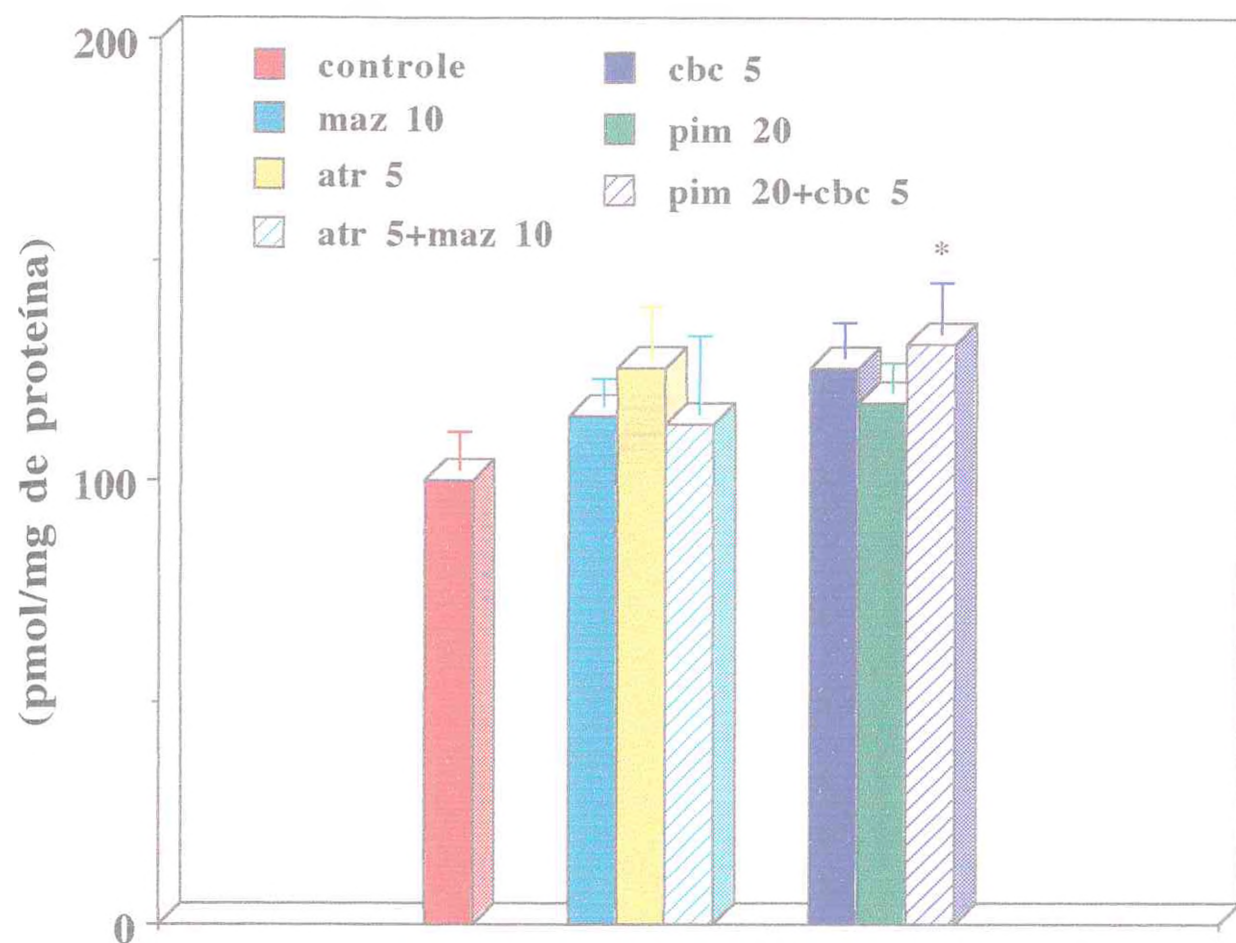


Figura 3 - Efeito da administração de carbacol e atropina, sozinhos ou associados com pimozida ou mazindol, respectivamente, sobre os níveis de AMPc em corpo estriado de rato. Ratos Wistar (180 - 200 g) foram mortos por decapitação; as regiões cerebrais foram removidas e pesadas, e a concentração de AMPc foi medida como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos. Os experimentos foram realizados em duplicata, cada grupo com 6 a 10 animais. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

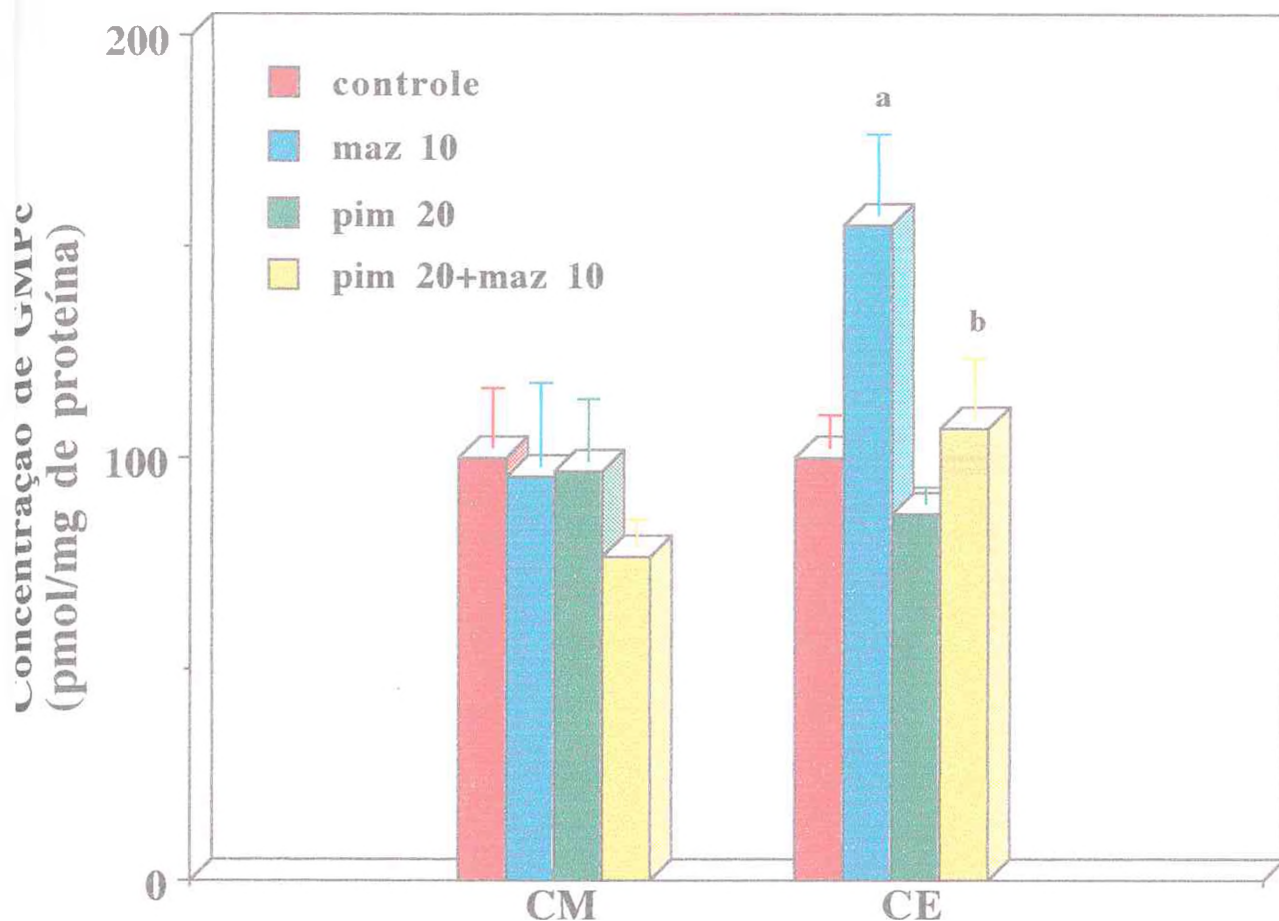


Figura 4 - Efeito da administração de mazindol e pimozida, sozinhos ou associados sobre os níveis de GMPC em córtex motor e corpo estriado de rato. Ratos adultos-jovens foram mortos por decapitação; as regiões cerebrais foram removidas e pesadas, e a concentração de GMPC foi medida como descrito em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM do 10 a 13 experimentos, os quais foram realizados em duplicata, cada grupo com 10 a 15 animais. Para análise estatística dos dados foi utilizado ANOVA e teste de Fisher *post hoc*. a, b= $p < 0,05$ quando comparado ao controle e mazindol, respectivamente.

DISCUSSÃO

O efeito de agonistas muscarínicos sobre os níveis de AMPc e GMPc é dependente do subtipo de receptor envolvido. Ge *et al.*, (1995) mostraram que a pilocarpina, agonista muscarínico seletivo para o receptor do subtipo M1, aumentou o conteúdo de GMPc mas não causou nenhuma alteração nos níveis de AMPc no córtex cerebral. Este aumento de GMPc foi antagonizado por pirenzepina e escopolamina. Jope *et al.*, (1992) também mostraram que a administração de pilocarpina não alterou a concentração de AMPc em córtex cerebral e hipocampo de rato, embora tenham apresentado uma tendência a um aumento dos níveis deste nucleotídeo em hipocampo. Sobre os níveis de GMPc a pilocarpina induziu um pequeno aumento em córtex.

O efeito do carbacol, agonista do subtipo M2-símile parece variar dependendo da área estudada, considerando que esta droga não apresentou nenhuma alteração e tendência a um aumento, respectivamente dos níveis de AMPc em córtex motor e corpo estriado de rato. É possível que o efeito do carbacol seja também dependente da dose utilizada. Ge *et al.*, (1995) mostraram que o agonista M2, 6 beta-AN ($25 \mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$) reduziu os níveis de AMPc e GMPc no cerebelo e no córtex cerebral, enquanto que 6 beta-AN na dose de $12 \mu\text{g}/\text{Kg}^{-1}$ diminuiu somente os níveis de AMPc. As diminuições de GMPc e AMPc causadas por 6 beta-AN foram antagonizadas por AF-DX 116 e atropina, respectivamente.

No presente trabalho, o aumento significativo dos níveis de AMPc em corpo estriado, com a associação pimozida + carbacol sugere ocorrer uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico também a nível de segundos mensageiros. Há um envolvimento dos

receptores D2-símile no efeito do carbacol sobre os níveis de AMPc, onde o bloqueio destes receptores pela pimozida leva a um aumento significativo dos níveis de AMPc. É possível que a pimozida ao antagonizar o receptor D2-símile tenha estimulado a adenilil ciclase, aumentando conseqüentemente os níveis de AMPc.

A atropina, um antagonista muscarínico que interage tanto em receptores M1 como M2-símile, causou uma diminuição de AMPc no córtex motor, mas não no corpo estriado de ratos sugerindo diferentes mecanismos nas duas áreas. Quando associada ao mazindol, persistiu a diminuição observada com a atropina sozinha, embora em menor grau.

O SKF 38393 é um agonista muito potente nos receptores D1-símile e pouco potente no receptor D2-símile da hipófise (Brown *et al.*, 1980; Setler *et al.*, 1978; Watling & Dowling, 1981). Stoof & Keabian (1981) mostraram que esta droga causou um aumento tempo e dose-dependente no fluxo de AMPc em corpo estriado de rato. A flufenazina atenuou este aumento do fluxo de AMPc provocado pelo SKF 38393. Entretanto, a sulpirida, um antagonista D2 da hipófise (Munemura *et al.*, 1980; Scapagnini, 1979) que não tem ação antagonista em D1-símile (Spano *et al.*, 1979) não alterou o fluxo de AMPc, mas induziu uma potencialização estatisticamente insignificante do efeito do SKF 38393. Estes resultados demonstram que o fluxo de AMPc em corpo estriado de rato é um sinal da estimulação do receptor D1-símile neste tecido.

Stoof & Keabian (1981) também mostraram que a apomorfina um agonista dopaminérgico que age tanto em receptores D1 como em D2-símile aumentou o fluxo de AMPc somente na presença de (-) sulpirida. A dopamina, um agonista de receptores D1 (Watling & Dowling, 1981) e D2-símile em hipófise (Munemura *et al.*, 1980)

aumentou o fluxo de AMPc no corpo estriado de rato. Interessantemente a (-) sulpirida potenciou o fluxo de AMPc estimulado por dopamina enquanto a (+) sulpirida foi inefetivo.

O Ly 141865, um agonista do receptor D2 em hipófise (Bach *et al.*, 1980; Tsuruta *et al.*, 1981), que não tem efeito em receptor D1 de retina de peixe ou corpo estriado de rato (Tsuruta *et al.*, 1981) não estimulou o fluxo de AMPc nem na presença ou ausência de (-) sulpirida. Por outro lado, o Ly 141865 reduziu o fluxo de AMPc estimulado por SKF 38393. Este efeito inibitório foi revertido pela (-) sulpirida (Stoof & Keabian, 1981).

Baseados nestes resultados obtidos com dopamina, apomorfina e Ly 141865, Stoof & Keabian (1981), propõem a existência de um segundo receptor dopaminérgico no corpo estriado, regulando o fluxo (e por inferência a formação) de AMPc. A estimulação deste receptor inibe a formação de AMPc que ocorre como uma consequência da estimulação do receptor D1. De acordo com esta interpretação, a dopamina interage com ambos os subtipos de receptores no corpo estriado simultaneamente estimulando e inibindo a formação e o fluxo de AMPc. A (-) sulpirida potencia o fluxo estimulado por dopamina bloqueando o segundo receptor dopaminérgico, removendo a influência inibitória sobre a formação de AMPc e, portanto, estimulando o fluxo observado de AMPc. Da mesma forma, a apomorfina estimula ambos os receptores dopaminérgicos; (-) sulpirida antagoniza a interação entre apomorfina e o segundo receptor dopaminérgico, portanto, permitindo a interação entre apomorfina e o receptor D1 que como consequência produz um aumento no fluxo de AMPc.

Similarmente, o presente trabalho mostra que a pimozida, também um antagonista D2-símile, não alterou os níveis de AMPc, mas quando associada ao mazindol, causou um aumento significativo nos níveis deste nucleotídeo. O mazindol inibe a recaptação de dopamina, deixando mais dopamina disponível para interagir com receptores D1 ou D2-símile. Provavelmente, o efeito é contrabalançado, não dando para observar um aumento estatisticamente significativo. Entretanto, em animais pré-tratados com pimozida, esta droga impede a interação de dopamina com os receptores D2, sendo evidente o aumento nos níveis de AMPc induzido pela estimulação dos receptores D1-símile. Além do mais, tem sido recentemente demonstrado que a administração de cocaína, que tem um mecanismo de ação similar ao do mazindol, pode aumentar a atividade da adenilil ciclase e da proteína cinase C dependente de AMPc, ambas as quais podem ser reguladas pelos receptores dopaminérgicos D1-símile (Terwilliger *et al.*, 1991).

Seria importante, contudo, confirmar estes resultados através de testes *in vitro*. É possível que estes efeitos sejam seletivos para córtex motor, considerando que no corpo estriado estes efeitos não foram observados. De fato como citado anteriormente vários autores obtiveram resultados diferentes dependendo da área estudada. Os resultados obtidos podem também sugerir que o aumento ocorrido nos níveis de AMPc em córtex motor de rato é um sinal da estimulação do receptor D1 neste tecido. Entretanto, deve-se ter cautela na interpretação destes resultados de vez que os mesmos podem depender do esquema de tratamento utilizado ou mudanças *postmortem* nos níveis dos nucleotídeos após a decapitação. Embora os resultados apresentados demonstrem uma consequência da estimulação do receptor em córtex motor de ratos, as consequências fisiológicas da estimulação de ambos os

subtipos de receptores D1 e D2-símile nesta área cerebral ainda não estão claramente definidas.

O fato da pimozida sozinha não ter efeitos sobre os níveis de GMPc, mas quando associada ao mazindol, bloquear o aumento ocorrido com esta droga sozinha sugere que o aumento dos níveis de GMPc pode estar envolvido com a estimulação dos receptores D2-símile. Os resultados também sugerem que a regulação da concentração de GMPc ocorrida após o tratamento com mazindol e pimozida é diferente no córtex motor e corpo estriado. Estudos posteriores são necessários para clarificar os mecanismos e significado fisiológico da regulação de GMPc induzido por estas drogas neste estudo.

CONCLUSÕES

- O carbacol na dose utilizada não alterou os níveis de AMPc em corpo estriado, embora uma tendência a um aumento tenha sido observada. O fato da pimozida quando associada ao carbacol levar a um aumento significativo das concentrações de AMPc sugere uma interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico também a nível de segundos mensageiros onde os receptores D2 parecem exercer um papel nos efeitos do carbacol. É possível que o antagonismo de D2-símile estimule a adenilil ciclase.

- A atropina, um antagonista muscarínico que interage tanto em receptores M1 quanto M2-símile, causou uma diminuição dos níveis de AMPc no córtex motor, mas não no corpo estriado de rato sugerindo diferentes mecanismos nas duas áreas. A diminuição observada nos níveis de AMPc em córtex motor, não persistiu após a associação desta droga com o mazindol, sugerindo uma interação entre as mesmas no que se refere à regulação de AMPc em córtex motor.

PROTOCOLO VII

Efeito de agonistas e antagonistas muscarínicos ou dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor e corpo estriado de rato

INTRODUÇÃO

Os impulsos nervosos podem ser transmitidos através das junções sinápticas em frequências de várias centenas por segundos e é óbvio que devem haver meios eficientes de acabar com a ação do transmissor após cada impulso. Na maioria das sinapses colinérgicas envolvidas na neurotransmissão rápida, concentrações altas e localizadas de acetilcolinesterase (AChE) estão disponíveis para este propósito (Lefkowitz *et al.*, 1996). A AChE degrada a acetilcolina, com grande eficácia, em colina e acetato, ambos sem potência neurotransmissora significativa, e desta forma põe fim a ação do neurotransmissor.

A acetilcolinesterase é encontrada nos neurônios colinérgicos (dendritos, pericário e axônios) na vizinhança das sinapses colinérgicas e em outros tecidos, como por exemplo, nas hemácias. (Berkovitz & Katzung, 1994). É altamente concentrada na junção neuromuscular. A hidrólise da acetilcolina ocorre na vizinhança imediata do terminal nervoso (Lefkowitz *et al.*, 1996).

No SNC a acetilcolinesterase é encontrada em grandes quantidades na membrana pós-sináptica das sinapses colinérgicas (Meneguz *et al.*, 1992). Vários estudos mostram evidências de que esta enzima está também associada com os terminais nervosos colinérgicos pré-sinápticos (Atack *et al.*, 1983; Fischman *et al.*, 1986; Markis & Fischman, 1985).

As concentrações mais altas de colinesterase se encontram no núcleo caudado e putamen, onde os níveis são 5 a 20 vezes maiores do que no córtex, tálamo e substância negra (Burgen & Chipman, 1951; Fahn & Cote, 1968; Hebb, 1957; McGeer & McGeer, 1971). Estudos de fracionamento celular mostram que a maioria das colinesterases estão

associadas com estruturas de membranas de células nervosas (De Robertis *et al.*, 1963)

Os neurônios colinoceptivos expressam AChE com o objetivo de hidrolisar acetilcolina. Entretanto, somente um subgrupo de neurônios colinoceptivos dá uma reação histoquímica rica em AChE (Hasselmo *et al.*, 1992; Mesulam & Geula, 1991). Alguns destes neurônios são polimórficos e distribuídos preferencialmente nas camadas mais profundas e na substância branca subjacente. Outros são piramidais e estão localizados nas camadas III e V, especialmente em associação no córtex. É interessante notar que tais neurônios ricos em AChE têm uma baixa densidade nas áreas límbicas e paralímbicas, embora estas partes do córtex cerebral contenham a mais alta inervação colinérgica pré-sináptica (Mesulam, 1995).

Através de métodos histoquímicos convencionais, sabe-se que a AChE está presente em altas concentrações em neurônios catecolaminérgicos, proeminentemente incluindo células dopaminérgicas da substância negra. A AChE nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais não parece funcionar (pelo menos predominantemente) como uma enzima metabólica para a acetilcolina, embora haja um impulso colinérgico para esta região. A AChE é liberada de dentritos destes neurônios dopaminérgicos em resposta a certos estímulos. As funções específicas da AChE nos neurônios dopaminérgicos ainda não está clara (Greenfield, 1991).

OBJETIVOS

Estudar os efeitos de agonistas e antagonistas muscarínicos e dopaminérgicos, sozinhos ou associados sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor e corpo estriado de rato.

RESULTADOS

A **Figura 1** mostra os efeitos de drogas dopaminérgicas, agonistas e antagonistas, sozinhas ou administradas em associação sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor de ratos. Foi observado que o mazindol ($52,0 \pm 1,66$ nmol/mg de proteína/min) e a pimozida ($61,3 \pm 1,60$ nmol/mg de proteína/min), sozinhos ou associados (pimozida + mazindol = $54,3 \pm 1,40$ nmol/mg de proteína/min) não produziram efeito significativo sobre a acetilcolinesterase quando comparados ao controle ($56,0 \pm 2,27$ nmol/mg de proteína/min). Do mesmo modo, a apomorfina, sozinha, ($55,7 \pm 4,12$ nmol/mg de proteína/min) ou associada com a pimozida (pimozida + apomorfina = $60,8 \pm 2,33$ nmol/mg de proteína/min) não alterou esta atividade. A sulpirida, sozinha ($52,8 \pm 3,35$ nmol/mg de proteína/min) ou associada ao mazindol (sulpirida + mazindol), não produziu nenhuma alteração ($59,6 \pm 2,09$ nmol/mg de proteína/min). Entretanto, quando a sulpirida foi administrada 30 minutos antes da apomorfina, houve uma diminuição significativa (22 %) da atividade acetilcolinesterásica ($43,5 \pm 2,08$ nmol/mg de proteína/min), quando comparada ao controle, apomorfina e sulpirida isoladamente.

Diferentemente dos resultados observados em córtex motor, em corpo estriado foi detectado uma diminuição pequena (12 %), mas significativa da atividade acetilcolinesterásica do grupo tratado com mazindol ($247,9 \pm 12,22$ nmol/mg de proteína/min) em relação ao controle ($280,4 \pm 11,64$ nmol/m de proteína/min). Já a pimozida não alterou esta atividade ($312,3 \pm 13,95$ nmol/mg de proteína/min). Quando associados, pimozida + mazindol, houve um aumento de 19 % na atividade da acetilcolinesterase ($295,2 \pm 8,59$ nmol/mg de

proteína/min) quando comparado ao mazindol isoladamente (**Figura 2**).

A apomorfina, isoladamente não produziu efeito significativo ($255,5 \pm 8,02$ nmol/mg de proteína/min), mas quando associada a pimozida foi observada uma diminuição de 20 % ($249,5 \pm 8,05$ nmol/mg de proteína/min) quando comparado com a pimozida sozinha. A sulpirida sozinha, não produziu efeito significativo ($276,9 \pm 18,24$ nmol/mg de proteína/min), entretanto quando associada ao mazindol foi observada uma diminuição de 12 % ($247,0 \pm 10,05$ nmol/mg de proteína/min) quando comparado ao controle. Uma diminuição mais acentuada foi detectada na associação de sulpirida com apomorfina ($222,4 \pm 7,13$ nmol/mg de proteína/min), quando comparado ao controle e apomorfina isoladamente (**Figura 2**).

A **Figura 3** mostra que em córtex motor, a atropina, sozinha ($55,0 \pm 2,09$ nmol/mg de proteína/min) ou associada com o mazindol ($51,3 \pm 4,05$ nmol/mg de proteína/min) não produziu efeito significativo. Similarmente, o carbacol e a pimozida sozinhos ($56,0 \pm 4,30$ e $61,3 \pm 1,60$ nmol/mg de proteína/min, respectivamente) ou associados ($62,6 \pm 2,85$ nmol/mg de proteína/min) não alteraram esta atividade.

Entretanto, quando associados, pimozida + carbacol aumentaram significativamente a atividade da acetilcolinesterase ($62,6 \pm 2,85$ nmol/mg de proteína/min) quando comparado ao controle e carbacol sozinho. Em corpo estriado (**Figura 4**), foi visto que a diminuição ocorrida com o mazindol ($247,9 \pm 12,22$ nmol/mg de proteína/min) e a atropina ($247,2 \pm 12,52$ nmol/mg de proteína/min) isoladamente, permaneceu quando as duas drogas foram associadas ($239,5 \pm 5,94$

nmol/mg de proteína/min). O carbacol sozinho não alterou a atividade acetilcolinesterásica ($269,6 \pm 8,81$ nmol/mg de proteína/min), entretanto quando associado a pimozida ($323,9 \pm 25,14$ nmol/mg de proteína/min) permaneceu o aumento ocorrido com a pimozida sozinha ($312,8 \pm 13,95$ nmol/mg de proteína/min).

Os efeitos da cocaína sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor e corpo estriado são apresentados na **Tabela 1**. Em córtex motor a cocaína 5 mg/kg apresentou tendência (11 %) a uma diminuição ($48,4 \pm 1,85$ nmol/mg de proteína/min), a qual foi significativamente detectada com a dose de 50 mg/kg ($47,1 \pm 1,82$ nmol/mg de proteína/min) quando comparado ao controle ($54,1 \pm 2,75$ nmol/mg de proteína/min). Em corpo estriado não foi observada alteração significativa com cocaína nas doses de 5 e 50 mg/kg ($256,4 \pm 13,31$ e $251,8 \pm 16,18$ nmol/mg de proteína/min, respectivamente), quando comparadas ao controle ($263,9 \pm 15,72$ nmol/mg de proteína/min).

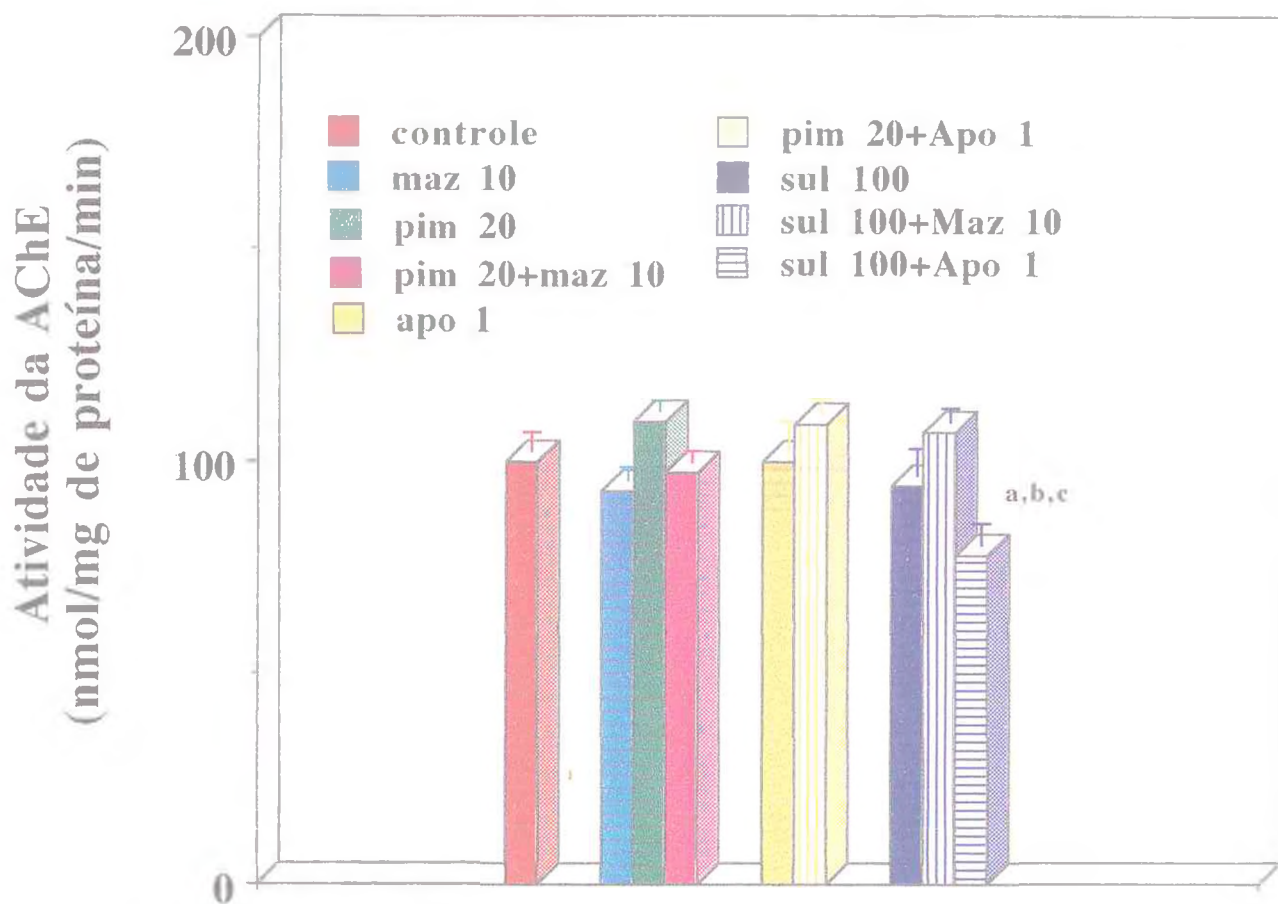


Figura 1 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor de rato. Ratos Wistar (150-180 g) foram tratados diariamente durante 7 dias com maz 10, pim 20, apo 1, sul 100, sozinhos ou associados (pim 20 + maz 10; pim 20 + apo 1; sul 100 + maz 10; sul 100 + apo 1). Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e a atividade acetilcolinesterásica determinada como descrita em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos cada grupo experimental com 6 a 10 animais. Para análise estatística foi utilizado a análise de variância e o teste de Fisher como teste *post hoc*. **a, b, c** = $p < 0,05$ quando comparados ao controle, apomorfina e sulpirida.

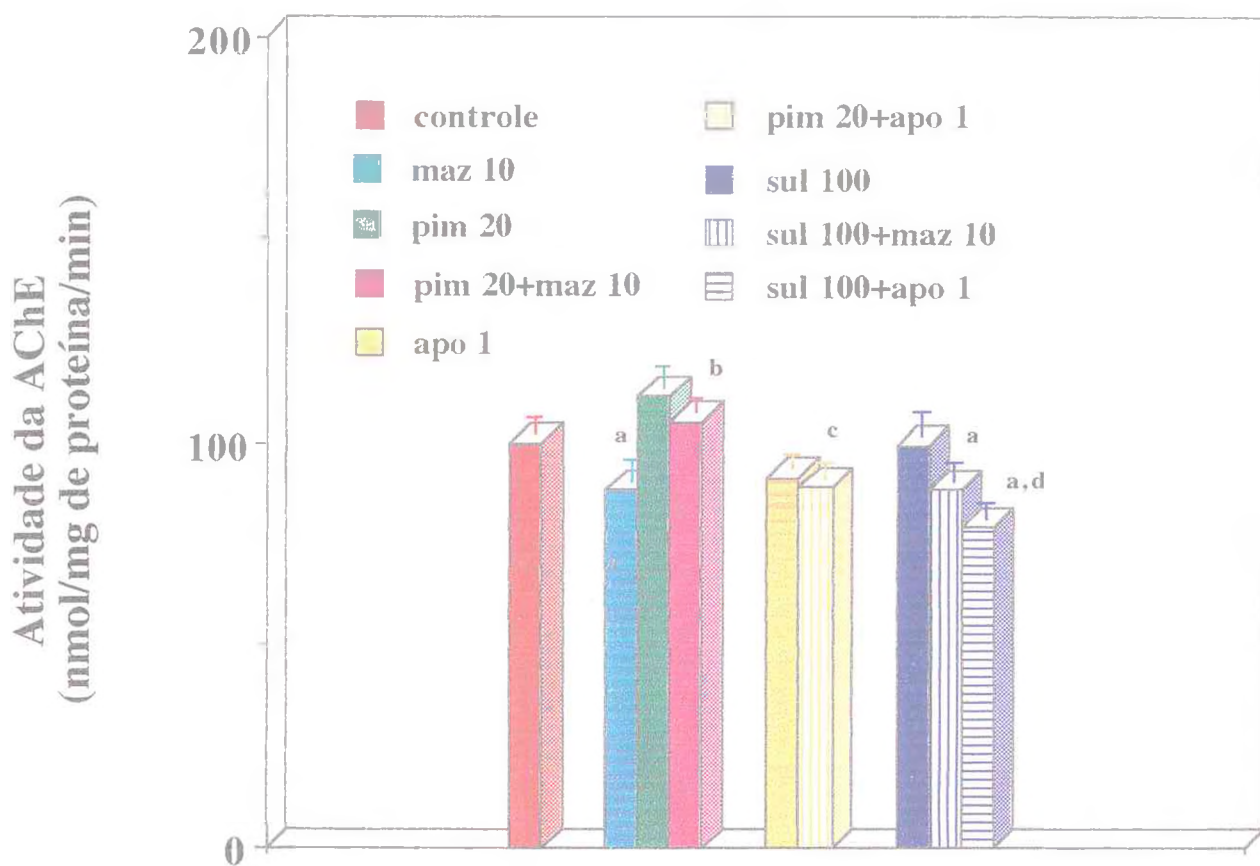


Figura 2 - Efeito de agonistas e antagonistas dopaminérgicos sobre a atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de rato. Ratos Wistar (150-180 g) foram tratados diariamente durante 7 dias com maz 10, pim 20, apo 1, sul 100, sozinhos ou associados (pim 20 + maz 10; pim 20 + apo 1; sul 100 + maz 10; sul 100 + apo 1). Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e a atividade acetilcolinesterásica determinada como descrita em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos, cada grupo com 6 a 10 animais. Para análise estatística foi utilizado a análise de variância e o teste de Fisher como teste *post hoc*. **a, b, c, d** = $p < 0.05$ quando comparados ao controle, mazindol, pimizida e apomorfina.

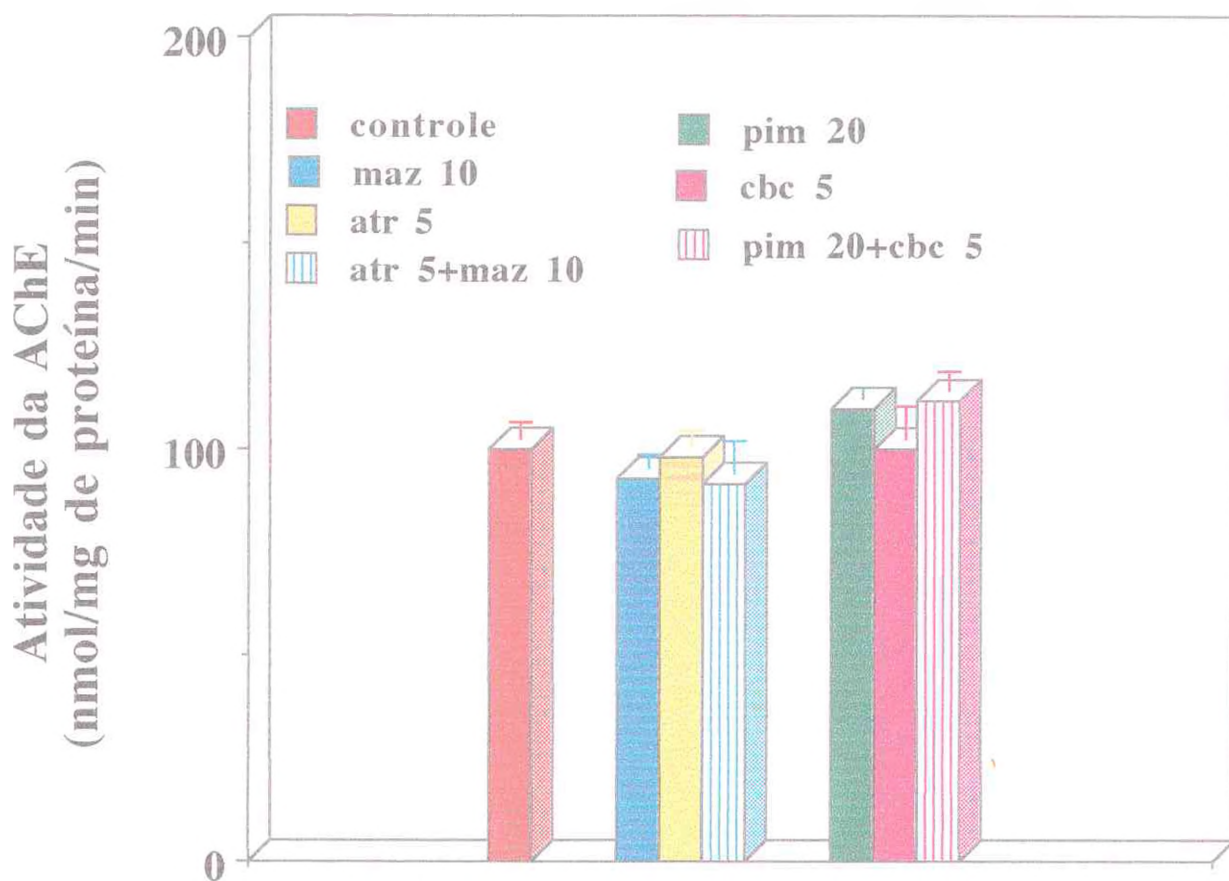


Figura 3 - Efeito do carbacol e atropina sobre a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor de rato. Ratos Wistar (150-180 g) foram tratados diariamente durante 7 dias com maz 10, pim 20, atr 5 e cbc 5 sozinhos ou associados (pim 20 + cbc 5; atr 5 + maz 10). Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e a atividade acetilcolinesterásica determinada como descrita em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos, cada grupo experimental com 6 a 10 animais. Para análise estatística foi utilizado a análise de variância e o teste de Fisher como teste *post hoc*.

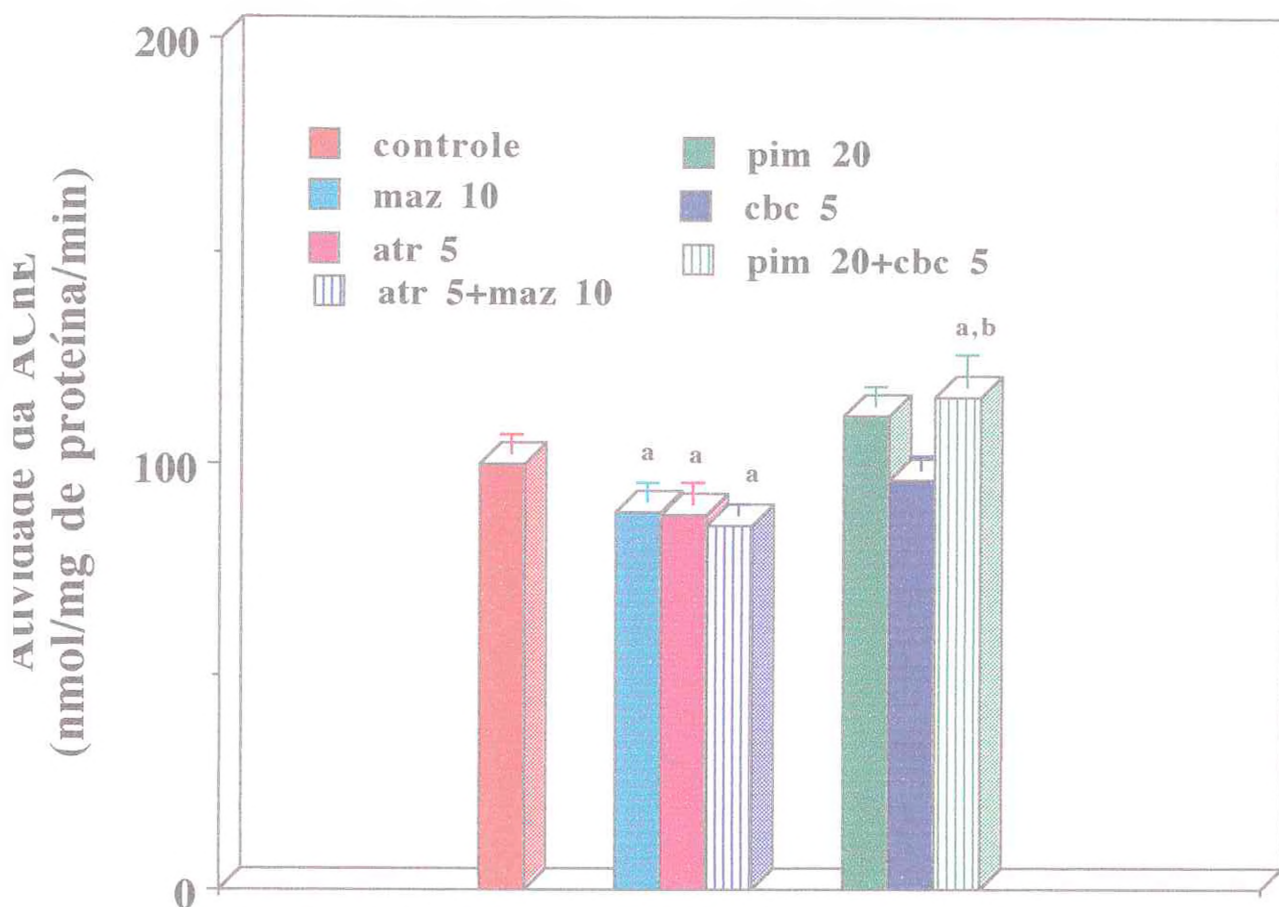


Figura 4 - Efeito do carbacol e atropina sobre a atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de rato. Ratos Wistar (150-180 g) foram tratados diariamente durante 7 dias com maz 10, pim 20, atr 5 e cbc 5 sozinhos ou associados (pim 20 + cbc 5; atr 5 + maz 10). Vinte e quatro horas após a última administração os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e a atividade acetilcolinesterásica determinada como descrita em Materiais e Métodos. Os valores representam média \pm EPM de 5 a 10 experimentos, cada grupo experimental com 6 a 10 experimentos. Para análise estatística foi utilizado a análise de variância e o teste de Fisher como teste *post hoc*. **a**, **b** = $p < 0,05$ quando comparado ao controle e carbacol.

DISCUSSÃO

Através de análises morfológicas e bioquímicas foi demonstrado que o tratamento crônico com haloperidol em ratos estava associado com perda de neurônios colinérgicos em várias regiões cerebrais (corpo estriado > hipocampo > córtex (Mahadik *et al.*, 1988a). Posteriormente foi verificado que esta perda refletia um nível aumentado de AChE neuronal específica no plasma (Korenovski *et al.*, 1990). A lesão dos neurônios colinérgicos estriatais causa a liberação de AChE no plasma, provavelmente através do líquido cefaloraquidiano (LCR) (Chubb *et al.*, 1976). Níveis aumentados de AChE foram encontrados no soro de pacientes esquizofrênicos bem como de outros pacientes psiquiátricos que se trataram com neurolépticos (Deutsch & Campbell, 1984; Jope *et al.*, 1985).

No córtex e no hipocampo a AChE está presente também em neurônios não colinérgicos. Foi sugerido (Mahadik *et al.*, 1988a) que estes níveis aumentados de enzimas colinérgicas provavelmente refletiam uma atividade colinérgica aumentada e um *turnover* de ACh aumentado (Costa *et al.*, 1978; Sethy, 1976; Sethy & Van Woert, 1974; Trabuchi *et al.*, 1974), captação de colina (Pedata *et al.*, 1980) e liberação de ACh evocada por potássio em fatias de corpo estriado (Kerwin *et al.*, 1984).

Mahadik & Mukherjee (1995) mostraram que o tratamento com haloperidol durante 8 dias aumentou os níveis de ChAT no corpo estriado, hipocampo e córtex de ratos, e os níveis de AChE no corpo estriado. Também tem sido mostrado que no cérebro o tratamento com haloperidol bloqueia a inibição da dopamina sobre a atividade colinérgica através do bloqueio de receptores colinérgicos que estão localizados nos neurônios colinérgicos (Coyle & Campochiaro 1976;

Kubota *et al.*, 1987; Scheel-Kruger, 1985). Esta função colinérgica aumentada após o tratamento crônico com haloperidol é também consistente com estudos clínicos que mostram que as ações agudas associadas com o tratamento com haloperidol podem ser suprimidas pelo tratamento com drogas anticolinérgicas (Johnstone *et al.*, 1983; Singh & Kay, 1985).

A atividade acetilcolinesterásica observada foi 5 vezes maior em corpo estriado do que em córtex motor, confirmando dados da literatura de que as concentrações mais altas de colinesterase se encontram no núcleo caudado e putamen, onde os níveis desta enzima são 5 a 20 vezes maiores do que no córtex, tálamo e substância negra (Burgen & Chipman, 1951; Fahn & Cote, 1968; Hebb, 1957; McGeer & McGeer, 1971).

No presente trabalho foram observadas interações entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico em nível de atividade enzimática. Esta interação ocorreu na mesma direção, ou seja, o mazindol, agonista dopaminérgico, e a atropina, antagonista muscarínico, interferiram na atividade acetilcolinesterásica, de forma similar.

A ação de agonistas e antagonistas dopaminérgicos e colinérgicos sozinhos ou associados parece ser seletiva para corpo estriado com exceção da cocaína (que teve atividade somente em córtex) e da associação sulpirida + apomorfina que diminuiu a atividade da acetilcolinesterase em corpo estriado e córtex. A interação dopamina acetilcolina ocorreu no sentido de que os agonistas dopaminérgicos indiretos (mazindol e cocaína) diminuíram a atividade acetilcolinesterásica. Provavelmente a inibição da recaptação de

dopamina por estas drogas, propicia a ação inibitória deste neurotransmissor sobre a atividade da acetilcolinesterase.

Os antagonistas dopaminérgicos não apresentaram efeitos isoladamente, embora a pimozida tenha apresentado uma tendência a aumentar esta atividade. É possível que o haja envolvimento dos receptores D2 no efeito do mazindol pois na presença da pimozida este efeito foi bloqueado. Entretanto, o neuroléptico atípico, sulpirida não interferiu no efeito do mazindol. A literatura mostra que em vários parâmetros há realmente diferenças entre os diversos neurolépticos típicos e atípicos.

Considerando que alguns efeitos colaterais tais como a discinesia tardia que ocorre em pacientes tratados com neurolépticos típicos melhoram com a coadministração de anticolinérgicos, o presente trabalho também verificou os efeitos de agonistas e antagonistas colinérgicos muscarínicos e sua associação com agonistas e antagonistas dopaminérgicos também sobre a atividade acetilcolinesterásica. A diminuição da atividade da AChE causada pela atropina e mazindol persistiu quando estas duas drogas estavam associadas, indicando que a atropina não interfere no efeito do mazindol.

A ausência de efeito do carbacol, sobre a atividade acetilcolinesterásica, pode ser devido a dose utilizada. A pimozida na presença do carbacol causou um aumento da atividade enzimática, efeito que pode estar relacionado à sua interação com receptores D2. De fato a pimozida não parece interagir com receptores muscarínicos. Contudo, sabe-se que os receptores muscarínicos diminuem a liberação de dopamina dos terminais nervosos dopaminérgicos no corpo estriado (Warpman *et al.*, 1996). Os receptores muscarínicos M1 (Xu *et al.*,

1989) que se localizam pré-sinápticamente atuam estimulando a liberação de dopamina, enquanto os receptores M2 cuja localização ainda não é precisamente definida diminuem a liberação de dopamina no corpo estriado *in vivo* (De Klippel *et al.*, 1993). É possível que o carbacol diminuindo a liberação de dopamina, diminuiu também sua influência inibitória sobre a atividade acetilcolinesterásica potenciando assim o efeito da pimozida que sozinha já havia apresentado uma tendência a um aumento desta atividade enzimática.

Mazindol e cocaína inibiram a atividade acetilcolinesterásica, assim levando a um aumento da atividade colinérgica central. Estes dados poderiam indicar que estas drogas poderiam ser utilizadas no tratamento, por exemplo, da doença senil do tipo Alzheimer. Entretanto, vale salientar que a percentagem de inibição da atividade acetilcolinesterásica induzida por estas drogas foi muito pequena.

CONCLUSÕES

- Os agonistas dopaminérgicos, mazindol e cocaína, diminuíram a atividade acetilcolinesterásica indicando uma interação a nível de atividade enzimática do sistema colinérgico.

- A pimozida, antagonista dopaminérgico, bloqueou a inibição da atividade da acetilcolinesterase ocorrida com o mazindol, indicando que os receptores D2-símile influenciam de alguma forma esta atividade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O estudo dos receptores dopaminérgicos e colinérgicos é muito importante para o entendimento dos sistemas dopaminérgico e colinérgico e de suas implicações fisiológicas, bem como para o esclarecimento e tratamento das várias doenças a estes sistemas vinculadas.

- A relevância de se estudar a interação entre os sistemas dopaminérgico e colinérgico se evidencia em doenças (Parkinsonismo, Alzheimer, entre outras) nas quais claramente ocorre um desequilíbrio entre os dois sistemas e nas quais são usadas drogas que de um modo ou de outro afetam ambos os sistemas.

- O presente estudo mostra que a interação entre estes sistemas pode ocorrer no mesmo sentido ou em sentidos opostos, como consequência de fatores tais como por exemplo, seletividade da droga pelo receptor, dose utilizada e área cerebral estudada.

- Agonistas dopaminérgicos diretos (apomorfina) ou indiretos (mazindol e cocaína) influenciam o sistema muscarínico aumentando a densidade de receptores muscarínicos. Este efeito é diferencial sobre os subtipos de receptores muscarínicos.

- Antagonistas dopaminérgicos apresentam efeitos diferentes sobre a densidade de receptores muscarínicos que podem variar em termos qualitativos e quantitativos dependendo da droga utilizada e da área cerebral estudada.

- A ativação ou bloqueio dos receptores muscarínicos também afeta o sistema dopaminérgico.

- Esta interação dopamina-acetilcolina se reflete também a nível de nucleotídeos cíclicos, e atividade enzimática da acetilcolinesterase, bem como sobre o comportamento de animais administrados com drogas que atuam nos dois sistemas de neurotransmissão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- **AHLENIUS, S. & HILLEGART, V.** Involvement of extrapyramidal motor mechanisms in the suppression of locomotor activity by antipsychotic drugs: a comparison between the effects produced by pre and post-synaptic inhibition of dopaminergic neurotransmission. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 1409-1415, 1986.
- **AIZENSTEIN, M. L.; SEGAL, D. S. & KUCZENSKI, R.** Repeated amphetamine and fencamfamine: Sensitization and reciprocal cross-sensitization. *Neuropsychopharmacol.* 3: 283-290, 1990.
- **AJIMA, A.; YAMAGUCHI, T. & KATO, T.** Modulation of Acetylcholine Release by D1, D2 Dopamine Receptors in Rat Striatum under Freely Moving Conditions. *Brain Res.* 518: 193-198, 1990.
- **ALBURGES, M. E.; NARANG, N.; JOHNSON, C. & WAMSLEY, J. K.** Dose-dependent changes in the rat dopaminergic receptor system after chronic administration of cocaine. *Soc. Neurosc.* 18: 1079, 1992.
- **ALBURGES, M. E. & WAMSLEY, J. K.** Effects on monoamine levels in rat CNS after chronic administration of cocaine. *Invest. Clin.* 34 (4): 181-192, 1993.
- **ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R. & STRICK, P. L.** Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. *Annu. Rev. of Neurosci.* 9: 357-381, 1986.
- **ALLES, G. A. & HAWES, R. C.** Cholinesterase in the blood of man. *J. Biol. Chem.* 53: 110-124, 1953.
- **ALTER, C. A.; WASLEY, A. M.; NEALE, R. F. & STONE, G. A.** Typical and atypical antipsychotic occupancy of D2 and S2 receptors: An autoradiographic analysis in rat brain. *Brain Res. Bull.* 16: 517-525, 1986.
- **AMABEOKU, G. J.** Some behavioral effects of chloroquine in rats suggesting dopaminergic activation. *Indian J. Med. Res.* 99: 87-94, 1994.
- **AMARA, S. G. & KUCHAR, M. J.** Neurotransmitter transporters. *Annu. Rev. Neurosci.* 16: 73-93, 1993.

- **ANDERSEN, P. H.; GINGRICH, J. A. & BATES, M. D.** Dopamine receptor subtypes: beyond the D1/D2 classification. *Trends Pharmacol. Sci.* 11: 231-236, 1990.
- **ANDERSEN, P. H.; GRONVALD, F. C.; HOHLWEG, R.; HANSEN, L. B.; GRUDDAL, E.; BRAESTRUP, C. & NIELSEN, E. B.** NNC-112, NNC-687 and NNC-756, new selective and highly potent dopamine D1 receptor antagonists. *Eur. J. Pharmacol.* 219: 45-52, 1992.
- **ARNT, J.; HYTTEL, J. & PERREGAARD, J.** Dopamine D1 receptor agonists combined with the selective D2 agonist quinpirole facilitate the expression of oral stereotyped behavior in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 133: 137-145, 1987.
- **ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; PERALTA, E. G.; PETERSON, G. L.; SCHIMERLIK, M. I.; CAPON, D. J. & RAMACHANDRAN, J.** A M2 muscarinic receptor subtype coupled to both adenylyl cyclase and phosphoinositide turnover. *Science* 238: 672-675, 1987.
- **ASHMAN, D. F.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 11: 330-334, 1963.
- **ATAK, J. R.; PERRY, E. K.; BONHAM, J. R.; PERRY, R. H.; TOMLINSON, B. E.; BLESSED, G. & FAIRBAIRN, A.** Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of the Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett.* 40: 199-204, 1983.
- **BACH, N. J.; KORNFELD, E. C.; JONES, N. D.; CHANEY, M. O.; DORMAN, D. E.; PASCHAL, J. W.; CLEMENS, J. A. & SMALSTIG, E. B.** Bicycle and tricycle ergoline partial structures. Rigid 3-(2-aminoethyl)pyrroles and 3- and 4-(2-aminoethyl)pyrazoles as dopamine agonists. *J. Med. Chem.* 23: 481-491, 1980.
- **BAKER, L. E.; RIDDLE, E. E.; SAUNDERS, R. B. & APELL, J. B.** The role of monoamine uptake in the discriminative stimulus effects of cocaine and related compounds. *Behav. Pharmacol.* 4: 69-79, 1993.
- **BALDO, B. A. & KELLY, A. E.** Cross-sensitization between cocaine and GBR 12909, a dopamine uptake inhibitor. *Brain Res. Bull.* 27: 105-108, 1991.
- **BALDESSARINI, R. J.** Drugs and the treatment of psychiatric disorders. In: Hardaman J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B.,

Ruddon, R.W., Gilman, A. G. *Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª. edição, 399-430, 1996.

- **BAUMGOLD, J. PAEK, R. & FISKUN, G.** Calcium independence of phosphoinositide hydrolysis-induced increase in cyclic AMP accumulation in SK-N-SH human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* 58: 1754-1759, 1992.
- **BEN-BARAK, J.; & DUDAI, Y.** Scopolamine induces an increase in muscarinic receptor level in rat hippocampus. *Brain Res.* 193: 309-313, 1980.
- **BERGER, P.; GAWIN, F. & KOSTEN, T. R.** Treatment of cocaine abuse with mazindol. *Lancet* 1: 283, 1989.
- **BERKOVITZ, B. A. & KATZUNG, B. G.** Avaliações básica e clínica dos novos medicamentos. In: Katzung, B. G. *Farmacologia Básica e Clínica*, 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 46-52, 1994.
- **BERNARDI, M. M. & PALERMO-NETO, J.** Effects of abrupt and gradual withdrawal from long-term haloperidol treatment on open-field behavior of rats. *Psychopharmacol.* 65: 247-250, 1979.
- **BERNARDI, M. M.; DE SOUZA, H. & PALERMO-NETO, J.** Effects of single and long-term haloperidol administration on open-field behavior of rats. *Psychopharmacol.* 73: 171-181, 1981.
- **BERSTEIN, G. & HAGA, T.** Molecular aspects of muscarinic receptors. In: Osborne, N. N. *Current aspects of the neurosciences I*. New York: Macmillan Press, 245-284, 1990.
- **BERSUDSKY, Y.; VINNITSKY, I. & GRISARU, N.** The effect of inositol on lithium-induced polyuria-polydipsia in rats and humans. *Hum Psychopharmacol. Clin. Exp.* 7: 403-407, 1992.
- **BERTORELLI, R. & CONSOLO, S.** D1 and D2 Dopaminergic Regulation of Acetylcholine Release from Striata of Freely Moving Rats. *J. Neurochem.* 54: 2145-2148, 1990.
- **BERTORELLI, R.; ZAMBELLI, M.; DI CHIARA, G. & CONSOLO, S.** Dopamine depletion preferentially impairs D1-over D2 receptor regulation of striatal *in vivo* acetylcholine release. *J. Neurochem.* 59: 353-357, 1992.

- **BLOOM, J. W.; HALONEN, M. & YAMAMURA, H. I.** Characterization of muscarinic cholinergic receptor subtypes in human peripheral lung. *Mol. Pharmacol.* 244: 625-632, 1988.
- **BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A. C. & BRANN, M. R.** Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 237: 527-532, 1987.
- **BOYNTON, A. L. & WHITFIELD, J. F.** Advances in cyclic nucleotide research. In: Greengard, P. & Robinson, G. A. New York: Raven Press, 15: 193, 1983.
- **BOYSON, S. J.; MC GONICLE, P.; LUTHIN, G. R.; WOLFE, B. B. & MOLINOFF, P. B.** Effects of chronic administration of neuroleptic and anticholinergic agents on densities of D2 dopamine and muscarinic cholinergic receptors in rat striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 244 (3): 987-993, 1988.
- **BRAUN, A. R. & CHASE, T. N.** Behavioral effects of chronic exposure to selective D1 and D2 dopamine receptor agonists. *Eur. J. Pharmacol.* 147: 441-451, 1988.
- **BROWN, E. M.; ATTIE, M. F.; RUN, S.; GARDNER, D. G.; KEBABIAN, J. & AURBACH, G. D.** Characterization of dopaminergic receptors in dispersed bovine parathyroid cells. *Molec. Pharmacol.* 18: 335-340, 1980.
- **BROWN, F.; CAMPBELL, W.; MITCHELL, P. J. & RANDALL, K.** Dopamine autoreceptors and the effects of drugs on locomotion and dopamine synthesis. *Br. J. Pharmacol.* 84: 853-860, 1985.
- **BROWN, J. H. & TAYLOR, P.** Muscarinic receptors agonists and antagonists. In: Hardaman J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R.W., Gilman, A. G. *Goodman & Gilman's - The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª edição, cap. 7: 141-160, 1995.
- **BUSHNELL, P. J.** Effects of scopolamine on locomotion activity and metabolic rate in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 26: 195-198, 1987.
- **BUCKLEY, N. J.; BONNER, T. I. & BRANN, M. R.** Localization of a family of muscarinic receptor mRNAs in rat brain, *J. Neurosci.* 8:4646-4652, 1988.

- **BUNZOW, J. R.; VAN TOL, H. H. M. & GRANDY, D. K.** Cloning and expression of a rat D2 dopamine receptor cDNA. *Nature* 336: 783-787, 1988.
- **BURGEN, A. S. V. & CHIPMAN, L. M.** Cholinesterase and succinic dehydrogenase in the central nervous system of the dog. *J. Physiol. (Lond)*, 114: 296-305, 1951.
- **BURKE, R. E. & GREENBAUN, D.** Effect of post-mortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. *J. Neurochem.* 49: 592-6, 1987.
- **BUTCHER, L. L. & WOOLF, N. J.** Monoaminergic-cholinergic relationship and the chemical communication matrix of the substantia nigra and neostriatum. *Brain Res. Bull.* 9: 475-492, 1982.
- **BUZSAKI, G. & GAGE, F. H.** The cholinergic nucleus basalis: A key structure in neocortical arousal. In: Frotscher, M & Misgeld, U., *Central Cholinergic Transmission*, Birkhauser, Boston, 159-171, 1989.
- **CANDELL, L. M.; YUN, S. H.; TRAN, L. L. P. & EHLERT, F. J.** Differential coupling of subtypes of the muscarinic receptor to adenylate cyclase and phosphoinositide hydrolysis in the longitudinal muscle of the rat ileum. *Mol. Pharmacol.* 38: 689-697, 1990.
- **CARLINI, E. A.; CARLINI-COSTRIM, B. & NAPPO, S.** Illicit use of psychotropic drugs in Brazilian cities: 1987-1989. In: CEWG proceedings of epidemiologic trends in drug abuse. *DHHS Publication No. (ADM) 90-1.724; 1114-1115*, 1990.
- **CARLINI, E. A.; GALDURÓZ, J. C. F.; NOTO, A. R.; NAPPO, S. A.; LIMA, E. & ADIALA, J. C.** Revisão - perfil de uso da cocaína no Brasil. *J. Bras. Psiq.* 44(6): 287-303, 1995.
- **CARLSSON, A. & LINDQVIST, M.** Effect of chlorpromazine and haloperidol on the formation of 3-methoxytyramine in mouse brain. *Acta Pharmacol.* 20: 140-144, 1963.
- **CARLSSON, A.** The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacol.* 1: 179-186, 1988.
- **CASAMENTI, F.; COSI, C. & PEPEU, G.** Effect of D1 and D2 dopaminergic agonists and antagonists on cortical acetylcholine release in vivo . In: Dowdall, M.J. & Hawthorne, J.N., *Cellular*

and molecular basis of cholinergic function, Elis Horwood, Chichester, U.K., 245-249, 1987.

- CASAMENTI, F.; COSI, C.; DEFFENU, G.; ABBAMONDI, A. L. & PEPEU, G. Changes in cortical acetylcholine output induced by modulation of the nucleus basalis. *Brain Res. Bull.* 16: 689-695, 1986.
- CHASIN, A. A. M. & SALVADORI, M. C. Estimulantes do Sistema Nervoso Central. In: Oga S. *Fundamentos de toxicologia*, Ateneu Editora, São Paulo, 256-269, 1996.
- CHUBB, I. W.; GOODMAN, S. & SMITH, A. D. Is acetylcholinesterase secreted from central neurons into the cerebrospinal fluid ? *Neurosci.* 1: 57-62, 1976.
- CIVELLI, O. Molecular biology of the dopamine receptor subtypes. In: Bloom, F.E.; & Kupfer, D.J. *Psychopharmacol.* , New York: Raven press, Ltd, 155-161, 1995.
- CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R. & GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 281-307, 1993.
- CONN, M. P. *Neuroscience in Medicine*. Filadélfia: Lippincott company, 1995.
- CONSOLO, S.; GIROTTI, P.; RUSSI, G. & DI CHIARA, G. Endogenous dopamine facilitates striatal *in vivo* acetylcholine release by acting on D1 receptors localized in the striatum. *J. Neurochem.* 59: 1555-57, 1992.
- CONSOLO, S.; LADINSKY, H.; PUGNETTI, P.; FUSI, R. & CRUNELLI, V. Increase in rat striatal acetylcholine content by bromocriptine: Evidence for an indirect dopaminergic action. *Life Sci.* 29: 457-465, 1981.
- CONSOLO, S.; WU, C. F.; FIORENTINI, F.; LADINSKY, H. & VEZZANI, A. Determination of endogenous acetylcholine release in freely moving rats by transstriatal dialysis coupled to a radioenzymatic assay: effect of drugs. *J. Neurochem.* 48: 1459-1565, 1987.
- COOK, W. H.; LIPKINS, D. & MARKHAM, R. *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3607-3608, 1957.
- COSTA, E.; CHENEY, D. L.; MAO, C. C. & MORONI, F. Action of antischizophrenic drugs on the metabolism of gamma-

aminobutyric acid and acetylcholine in globus pallidus, striatum and nucleus accumbens. *Fed. Proc.* 37: 2408-2414, 1978.

- **COSTALL, B. & NAYLOR, R. J.** Mesolimbic and extrapyramidal sites for the mediation of stereotyped behavior patterns and hyperactivity by amphetamine and apomorphine in the rat. *Adv. Behav. Biol.* 21: 47-76, 1977.
- **COYLE, J. T. & CAMPOCHARO, P.** Ontogenesis of dopaminergic-cholinergic interaction in the rat striatum. *J. Neurochem.* 27: 673-678, 1976.
- **CRAWFORD, G. D.; CORREA, L. & SALVATERRA, P. M.** Interaction of monoclonal antibodies with mammalian choline acetyl-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7031-7035, 1982.
- **CREESE, I.; BURT, D. R. & SNYDER, S. H.** Dopamine receptor binding predicts clinical and pharmacological potencies of antipsychotic drugs. *Science* 192: 481-483, 1976.
- **CREESE, I. & SNYDER, S. H.** Chronic neuroleptic treatment and dopamine receptor regulation. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 24: 89-94, 1980.
- **CREESE, I.** Receptor interactions of neuroleptics. In: Coyle, J. T.; Enna, S. J. (eds) *Neuroleptics: neurochemical, behavioral and clinical perspectives*. New York: Raven Press, 194-196, 1983.
- **CUBEDDU, L. X.; HOFFMANN, I. S.; TALMACIU, R. K.; DILIBERTO, P. & LOVENBERG, T.** Carbachol-phorbol ester interactions at muscarinic receptors modulating dopamine release. *Neurosci. Lett.* 131: 245-248, 1991.
- **CUNNINGHAM, K. A. & CALLAHAN, P. M.** Monoamine reuptake inhibitors enhance the discriminative state induced by cocaine in the rat. *Psychopharmacol.* 104: 177-180, 1991.
- **DAMSMA, G.; DE BOER, P.; WESTERINK, B. H. C. & FIBIGER, H. C.** Dopaminergic Regulation of Striatal Cholinergic Interneurons: an *In Vivo* Microdialysis Study. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 342: 523-527, 1990a.
- **DAMSMA, G.; ROBERTSON, G. S.; THAM, C. & FIBIGER, H. C.** Dopaminergic regulation of striatal acetylcholine release: importance of D1 and N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 1064, 1991b.

- DAMSMA, G.; THAM, C.; ROBERTSON, G. S. & FIBIGER, H. C. Dopamine D1 Receptor Stimulation Increases Striatal Acetylcholine Release in the Rat. *Eur. J. Pharmacol.* 186: 335-338, 1990b.
- DAVIS, K. L.; HOLLISTER, L. E.; BERGER, P. A. & BARCHAS, J. D. Cholinergic imbalance hypotheses of psychoses and movement disorders: strategies for evaluation. *Psychopharmacol. Commun* 1: 533-543, 1975.
- DAY, J. & FIBIGER, H.C. Dopaminergic regulation of cortical acetylcholine release: effects of dopamine receptor agonists. *Neurosci.* 54 (3): 643-648, 1993.
- DEARRY, A.; GINGRICH, J. A.; FALARDEAU, P.; FREMEAU, R. T.; BATES, M. D. & CARON, M. G. Molecular cloning and expression of the gene for a human D1 dopamine receptor. *Nature* 347: 72-76, 1990.
- DE BOER, P.; DAMSMA, G.; FIBIGER, H. C.; TMMERMAN, W.; DEVRIES, J. B. & WESTERINK, B. H. C. Dopaminergic - Cholinergic Interactions in the Striatum : The Critical Significance of Calcium Concentrations in Brain Microdialysis. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 342: 528-534, 1990.
- DE KLIPPEL, N.; SARRE, S.; EBINGER, G. & MICHOTTE, Y. Effect of M1 and M2 muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism: an in vivo microdialysis study comparing normal and 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Brain Res.* 630: 57-64, 1993.
- DE ROBERTIS, E.; RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, G.; SALGANICOFF, L.; PEREGRINO DE IRALDI, A. & ZIEHER, L. M. Isolation of synaptic vesicles and structural organization of the acetylcholine system within brain nerve endings. *J. Neurochem.* 10: 225-235, 1963.
- DEUTSCH, S. I. & CAMPBELL, M. Status of acetylcholinesterase in blood in neuropsychiatric disorders. *Neurochem. Res.* 9: 863-869, 1984.
- DI CHIARA, G. & IMPERATO, A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5274-78, 1988.

- **DOHLMAN, H. G.; CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J.**
A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* 26: 2657-2664, 1987.
- **DOMBROWSKI, A. M.; JERKINS, A. A. & KAUFFMAN, F. C.** Muscarinic receptor binding and oxidative activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. *J. Neurosci.* 3(10): 1963-70, 1983.
- **DWOSKIN, L. P.; PERIS, J.; YASUDA, R. P.; PHILPOTT, K. & ZAHNISER, R.** Repeated cocaine administration results in supersensitivity of striatal D2 dopamine autoreceptor to pergolide. *Life Sci.* 42: 255-262, 1988.
- **DRACHMAN, D. A. & LEAVITT, J.** Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging ? *Arch Neurol.* 30: 113-121, 1974.
- **DRUKARCH, B. & STOOF, J. C.** D2 dopamine autoreceptor selective drugs: Do they really exist? *Life Sci.* 47: 361-376, 1990.
- **DRUMMOND, G. I.** *Advances in cyclic nucleotide research.* In: Greengard, P. & Robinson, G.A. New York: Raven Press, 15: 373, 1983.
- **DUNCAN, G. E.; CRISWELL, H. E.; MCCOWN, T. J.; PAUL, I. A.; MUELLER, R. A. & BREESE, G. R.** Behavioral and neurochemical responses to haloperidol and SCH 23390 in rats treated neonatally or as adults with 6-hydroxydopamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 1027-1034, 1987.
- **DURKIN, T. P.; HASHEM-ZADEH, H.; MANDEL, P.; KEMPF, J. & ABEL, A.** Genotypic variation in the dopaminergic inhibitory control of striatum and hippocampal cholinergic activity in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 19(1): 63-70, 1983.
- **EHLERT, F. J.; ROESKE, W. R. & YAMAMURA, H. I.** Molecular biology and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor. In: Bloom, F.E. & Kupfer, D.J. *Psychopharmacol.* , cap 10: 111-124, New York: Raven Press, Ltda., 1995.
- **EHLERT, F. J. & TRAN, L. L. P.** Regional distribution of M1, M2 and non-M1, non-M2 subtypes of muscarinic binding sites in rat brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255: 1148-1157, 1990.

- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, J. R. V. & FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7: 88-95, 1961.
- EXTON, J. H. *Advances in cyclic nucleotides research*, 12: 319. In: HAMET, P. & SANDS, H., New York: Raven Press, 1980.
- EXTON, J. H. Signaling through phosphatidylcholine breakdown. *J. Biol. Chem.* 265: 1-4, 1990.
- EZRIN-WATERS, C.; MULLER, P. & SEEMAN, P. Catalepsy induced by morphine or haloperidol: effects of apomorphine and anticholinergic drugs. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 54: 516-519, 1976.
- FAGE, D. & SCATTON, B. Opposing effect of D1 and D2 receptor antagonists on acetylcholine levels in the rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 359-362, 1986.
- FAHN, S. & COTE, L. J. Regional distribution of choline acetylase in the brain of the Rhesus monkey. *Brain Research* 7: 323-325, 1968.
- FELDER, R. A.; FELDER, C. A.; EISNER, G. M. & JOSE, P. A. The dopamine receptor in adult and maturing kidney. *Am. J. Physiol.* 257: F315-F325, 1989.
- FIELDER, E. P.; MARKS, M.J. & COLLINS, A. C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. *J. Neurochem.* 49: 983-990, 1987.
- FILLOUX, F.; LIU, T. J.; HSU, C. Y.; HUNT, M. A. & VANSLEY, J. K. Selective cortical infarction reduces 3H-sulpirida binding in rat caudate-putamen: autoradiographic evidence for presynaptic D2 receptors on corticostriate terminals. *Synapse* 2: 521-531, 1988.
- FISHMAN, E. B.; SICK, G. C.; MAC CALLUN, R. D.; BIRD, E. D.; VOLICER, L. & MARQUIS, J. K. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 19: 246-252, 1986.
- FRAY, P. J.; SAHAKIAN, B.; ROBBINS, T. W.; KOOB, G. F. & IVERSEN, S. D. An observational method for quantifying the behavioral effects of dopamine agonists:

contrasting effects of d-amphetamine and apomorphine. *Psychopharmacol.* 69: 253-259, 1980.

- **FREMEAU JR., R. T.; DUNCAN, G. E. & FORNARETTO, M. G.** Localization of D1 dopamine receptor mRNA in brain supports a role in cognitive, affective, and neuroendocrine aspects of dopaminergic neurotransmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3772-3776, 1991.
- **FRIEDMAN, E.; WANG, H. Y. & BUTKERAIT, P.** Decreased Striatal Release of Acetylcholine Following Withdrawal From Long- term Treatment with Haloperidol: Modulation by Cholinergic, Dopamine-D1 and D2- Mechanisms. *Neuropharmacol.* 29: 537-544, 1990.
- **FRUSSA-FILHO, R.; OTOBONI, J. R.; UEMA, F. T. & PALERMO-NETO, J.** Effects of age and isolation on the evolution of catalepsy during chronic haloperidol treatment. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 25: 925-928, 1992.
- **FRYER, A. D. & EL-FAKAHANY, E. E.** Identification of three muscarinic receptor subtypes in rat lung using binding studies with selective antagonists. *Life Sci.* 47: 611-618, 1990.
- **GE, X. O.; HU, G.; YAO, B.; XU, P. C. & BIAN, C. F.** Relationship between muscarinic receptor subtypes and cyclic nucleotides in pons-medulla oblongata. *Chung-Kuo-Yao-Li-Hsueh-Pao* 16: 408-11, 1995.
- **GEORGE, F. R. & RITZ, M. C.** Cocaine produces locomotor stimulation in SS but not LS mice: Relationship to dopaminergic function. *Psychopharmacol.* 101: 18-22, 1990.
- **GEORGE, F. R.; PORRINO, L. J.; RITZ, M. C. & GOLDBERG, S. R.** Inbred rat strain comparisons indicate different sites of action for cocaine and amphetamine locomotor stimulant effects. *Psychopharmacol.* (Berlin) 4: 457-462, 1991.
- **GEORGE, W. J.; POLSON, J. B.; O'TOOLE, A. G. & GOLDBERG, N. D.** Elevation of guanosine 3', 5'- cyclic phosphate in rat heart after perfusion with acetylcholine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 66: 398-403, 1970.
- **GILMAN, A.G.** *Annu Rev. Biochem.* 56: 615-649, 1987.
- **GOEDERS, N. E. & KUCHAR, M. J.** Chronic cocaine administration induces opposite changes in dopamine receptors in

the striatum and nucleus accumbens. *Alcohol Drug Res.* 7: 207-216, 1987.

- **GOGERTY, J. H.; PENBERTHY, C.; IORIO, L. C. & TRAPOLD, J. H.** Pharmacological analysis of a new anorexic substitute: 5-hydroxy-5-(4'-chlorophenyl)-2,3-dihydro-5H-imidazo(2,1-a) isoindole (mazindol). *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.* 214: 285-307, 1975.
- **GOLDBERG, N. R. & HADDOX, M. T.** Cyclic GMP. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 3: 155-223, 1973.
- **GRACE, A. A.** Cortical regulation of subcortical dopamine systems and its possible relevance to schizophrenia. *J. Neural. Transm.* 91: 111-134, 1993.
- **GRANDY, D. K.; ZHANG, Y. & BOUVIER, C.** Multiple D5 dopamine receptor genes: a functional receptor and two pseudogenes. *Proc. Natl. Sci. USA* 88: 9175-9179, 1991.
- **GRAYBIEL, A. M. & RAGSDALE, C. W.** Biochemical anatomy of the striatum. In: Emson, P. C. *Chemical Neuroanatomy*, 427-504, New York: Raven Press, 1983.
- **GREENFIELD, S. A.** A noncholinergic action of acetylcholinesterase (AChE) in the brain: from neuronal secretion to the generation of movement. *Cell. Mol. Neurobiol.* 11: 55-77, 1991.
- **HADCOCK, J. R. & MALBON, C. C.** Regulation of receptor expression by agonists: transcriptional and post-transcriptional controls. *Trends Neurol. Sci.* 14: 242-247, 1991.
- **HAGIWARA, Y.; TAGUCHI, K.; ATOBE, J.; SUZUKI, Y. & KUBO, T.** An investigation into the effects of apomorphine on the release of acetylcholine in the striatum of freely-moving rat using "in vivo" microdialysis. *Gen. Pharmacol.* 24: 1373-1377, 1993.
- **HALL, Z. A.** Three of a kind: the β -adrenergic receptor, the muscarinic acetylcholine receptor, and rhodopsin. *Trends Neuro. Sci.* 10: 99-100, 1987.
- **HAMAMAURA, T.; AKIYAMA, K.; AKIMOTO, K.; KASHIHARA, K.; OKUMURA, K.; UJIKE, H. & OTSUKI, S.** Co-administration of either a selective D1 or D2 dopamine antagonist with methamphetamine prevents methamphetamine-induced behavioral sensitization of

neurochemical changes, studied by *in vivo* intracerebral dialysis. *Brain Res.* 546: 40-46, 1991.

- **HAMET, P.** *Advances in cyclic nucleotide research*, 12: 11. In: Hamet, P. & Sandes, H. New York: Raven Press, 1980.
- **HARRISON, P. J.** Effects of neuroleptics on neuronal and synaptic structure. In: Barnes, T. E. R., *Antipsychotic Drugs and Their Side Effects* 99-110, London: Academic Press, 1993.
- **HASSELMO, M. E.; ANDERSON, B. P. & BOWER, J. M.** Cholinergic modulation of cortical associative memory function. *J. Neurophysiol.* 67: 1230-1246, 1992.
- **HATA, F.; TAKEYASU, K.; MORIKAWA, Y.; LAI, R. T.; ISHIDA, H. & YOSHIDA, H.** Specific changes in the cholinergic system in guinea-pig vas deferens after denervation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215: 716-722, 1980.
- **HEBB, C. O.** Biochemical evidence for the neurofunction of acetylcholine. *Physiol. Rev.* 37: 196-220, 1957.
- **HEIKKILA, R. E.; CABBAT, S. F.; MANZINO, L.; RONALD, G. B. & HOULIHAN, W. J.** Unexpected differences between mazindol and its homologs on biochemical and behavioral responses. *Amer. Soc. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 745-749, 1981.
- **HENRY, D. J.; GREENE, M. A. & WHITE, F. J.** Electrophysiological effects of cocaine in the mesoaccumbens dopamine system: repeated administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251: 833-839, 1989.
- **HENRY, D. J. & WHITE, F. J.** Repeated cocaine administration causes persistent enhancement of D1 dopamine receptor sensitivity within the rat nucleus accumbens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 882-890, 1991.
- **HIGASHI, H.; INANAGA, K.; NISHI, S. & UCHIMURA, N.** Enhanced dopamine actions on rat nucleus accumbens neurons *in vitro* after methamphetamine pre-treatment. *J. Physiol.* 408: 587-603, 1989.
- **HOFFMANN, I. S.; TALMACIU, R. K.; AQUINO, R. & CUBEDDU, L. X.** Differential effects of muscarinic receptor agonists and phorbol ester on muscarinic and D2-dopamine release-modulatory receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 278: 662-668, 1996.

- **HOLLISTER, L. E.** Fármacos antipsicóticos e lítio. In: Katzung, B.G., *Farmacologia Básica e Clínica*, 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 293-306, 1992.
- **HORNYKIEWICZ, O.** Dopamine and brain function. *Pharmacol. Res.* 18: 925-964, 1966.
- **HYTTEL, J.** SCH 23390: the first selective dopamine D1 antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 91: 153-154, 1983.
- **HUBNER, C. B. & MORETON, J. E.** Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on cocaine self-administration in the rat. *Psychopharmacol.* 105: 151-156, 1991.
- **HUGANIR, R. L. & GREENGARD, P.** Regulation of neurotransmitter receptor desensitization by protein phosphorylation. *Neuron* 5: 555-567, 1990.
- **HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M. & BUCKLEY, N. J.** Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30: 633-673, 1990.
- **IKAWA, K.; WATANABE, A.; KANENO, S. & TORU, M.** Modulation of 3H-mazindol binding sites in rat striatum by dopaminergic agents. *Eur. J. Pharmacol.* 250: 216-266, 1993.
- **IMPERATO, A.; OBINU, M. C.; CASU, M. A.; MASCIA, M. S.; DAZZI, L. & GESSA, G. L.** Evidence that neuroleptics increase striatal acetylcholine release through stimulation of dopamine D1 receptors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 266: 557-562, 1993.
- **IMPERATO, A.; OBINU, M. C.; DAZZI, L. & GESSA, G. L.** Does dopamine exert a tonic inhibitory control on the release of striatal acetylcholine *in vivo*? *Eur. J. Pharmacol.* 251: 271-279, 1994.
- **INVERNIZZI, R.; BERTORELLI, R.; CONSOLO, S.; GARATTINI, S. & SAMANIN, R.** Effects of the isomer of fenfluramine on dopamine mechanisms in rat brain: further studies. *Eur. J. Pharmacol.* 164: 241-248, 1989.
- **IORIO, L. C.; BARNETT, A.; LEITZ, F. H.; HOUSER, V. P. & KORDUBA, C. A.** SCH 23390, a potential benzazepine antipsychotic with unique interactions on dopaminergic system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226: 462-468, 1983.

- **JAMES, M. K. & CUBEDDU, L. X.** Frequency-dependent muscarinic receptor modulation of acetylcholine and dopamine release from rabbit-striatum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 229: 98-104, 1983.
- **JANSSON, C. C.; KUKKONEN, J. & AKERMAN, K. E. O.** Muscarinic receptor-linked elevation of cAMP on SH-SY-5Y neuroblastoma cells is mediated by Ca⁺² and protein kinase C. *Biochem. Biophys. Acta.* 1085: 255-260, 1991.
- **JANOWSKY, D. S.; EL-YOUSEF, M. K.; DAVIS, J. M. & SEKERKE, H. J.** Parasympathetic suppression of manic symptoms by physostigmine. *Arch. Gen. Psychiatry* 28: 542-545, 1973.
- **JANOWSKY, D. S.; EL-YOUSEF, M. K.; DAVIS, J. M. & SEKERKE, H. J.** A cholinergic-adrenergic hypothesis of mania and depression. *Lancet* 1: 632-635, 1972.
- **JAVITCH, J. A.; BLAUSTEIN, R. O. & SNYDER, S. H.** [3H]-Mazindol binding associated with neuronal dopamine and norepinephrine uptake sites. *Mol. Pharmacol.* 26: 35-44, 1984.
- **JOH, T. H.; GEGHAM, C. & REIS, D. J.** Immunocytochemical demonstration of increased tyrosine hydroxylase protein in sympathetic ganglia and adrenal medulla elicited by reserpine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2767-2771, 1973.
- **JOHANSON, C. E. & FISCHMAN, M. F.** The pharmacology of cocaine related to its abuse. *Pharmacol.* 41: 03-52, 1989.
- **JOHANSON, C. E. & SCHUSTER, C. R.** Cocaine. In: Bloom, F. E. & Kupfer, D. J., *Psychopharmacol.* New York: Raven Press, Ltd., 1685-1697, 1995.
- **JOHNSTONE, B. C.; CROW, T. J.; FERRIER, I. N.; OWENS, D. G. C.; BOURNE, R. C. & GAMBLE, S. J.** Adverse effects of anticholinergic medication on positive schizophrenic symptoms. *Psychol. Med.* 13: 513-527, 1983.
- **JOPE, R. S.; SONG, L. & KOLASA, K.** Inositol trisphosphate, cyclic AMP, and cyclic GMP in rat brain regions after lithium and seizures. *Biol. Psychiatry* 31: 505-514, 1992.
- **JOPE, R. S.; WALTER-RYAN, W. G.; ALARCON, R. D. & LALLY, K. M.** Cholinergic processes in blood samples from patients with major psychiatric disorders. *Biol. Psychiatry.* 20: 1258-1266, 1985.

- **JORGENSEN, H. A.; ANDREASSEN, D. A & HOLE, K.** The relationship between motor effects in rats following acute and chronic haloperidol treatment. *Psychopharmacol.* 116: 89-92, 1994.
- **JOYCE, J. N.** Differential response of striatal dopamine and muscarinic cholinergic receptor subtypes to the loss of dopamine. *Experimental Neurol.* 113: 261-276, 1991.
- **KALSNER, S. & WESTFALL, T.** Presynaptic receptors and the question of autoregulation of neurotransmitter release. *Ann. NY Acad. Sci.* 604, 1990.
- **KALIVAS, P. W.; DUFFY, P.; DUMARS, L. E. & SKINNER, C.** Behavioral and neurochemical effects of acute and daily cocaine administration in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 485-492, 1988.
- **KALIVAS, P. W.; DUFFY, P.** Effect of acute and daily cocaine treatment on extracellular dopamine in the nucleus *accumbens*. *Synapse* 5: 48-58, 1990.
- **KALIVAS, P. W. & STEWART, J.** Dopamine transmission in the initiation and expression of drugs- and stress-induced sensitization of motor activity. *Brain Res. Rev.* 16: 223-244, 1991.
- **KARPEN, J. W. & HESS, G. P.** Cocaine, phencyclidine and procaine inhibition of the acetylcholine receptor characterization of the binding site in stopped-flow measurement receptor-controlled ion flux and membrane vesicles. *Biochem.* 25: 1777-1785, 1986.
- **KARSON, C. N.; GARCIA-RILL, E. & BIEDERMANN, J.** The brain stem reticular formation in schizophrenia. *Psychiatry Res. Neuroimaging* 40: 31-48, 1991.
- **KASHIHARA, K.; VARGA, E. V.; WAITE, S. L.; ROESKE, W. R. & YAMAMURA, H. I.** Cloning of the rat M3, M4 and M5 muscarinic acetylcholine receptor genes by the polymerase chain reaction (PCT) and the pharmacological characterization of the expressed genes. *Life Sci.* 51: 955-971, 1992.
- **KEBABIAN, J. W. & CALNE, D. B.** Multiple receptors for dopamine. *Nature (Lond.)* 277: 93-96, 1979.

- KELLY, P. H. & IVERSEN, S. D. Selective 6-OHDA-induced destruction of mesolimbic dopamine neurons: Abolition of psychostimulant-induced locomotor activity in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 40: 45-56, 1975.
- KERWIN, R. W.; RUPNIAK, N. M. J.; JENNER, P. & MARSDEN, C. D. A comparison of the effect of acute and 1 year continuous neuroleptic treatment on the release of [3H]-glutamate and [3H]-acetylcholine from rat striatal slices. *Neurosci.* 11: 205-210, 1984.
- KESSLER, R. M.; ANSARI, M. S.; SCHMIDT, D. E.; DE PAULIS, T.; CLANTON, J. A.; INNIS, R.; AL TIKRITI, M.; MANNING, R. G. & GILLESPIE, D. High affinity dopamine D2 receptors. *Life Sci.* 49(8): 617-28, 1991.
- KLAWANS, H. L. The pharmacology of tardive dyskinesias. *Am. J. Psychiatry* 130: 82-86, 1973.
- KLEVEN, M. S.; PERRY, B. D.; WOOVERTON, W. L. & SEIDEN, L. S. Effects of repeated injections of cocaine on D1 and D2 dopamine receptors in rat brain. *Brain Res.* 532: 265-270, 1990.
- KOBAYASHI, R. M.; FIELDS, J. X.; HRUSKA, R. E.; BEAUMONT, K. & YAMAMURA, H. I. Brain neurotransmitter receptors and chronic antipsychotic drug treatment: A model for tardive dyskinesia. In: Hanin, I & Usdin, E., *Animal models in Psychiatry*, 405-409, New York: Pergamon Press, 1978.
- KOOB, G. F.; LE, H. T. & CREESE, I. D1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 increases cocaine self-administration in the rat. *Neurosci. Lett.* 79: 315- 320, 1987.
- KOOB, G. F. & BLOOM, F. E. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence *Science.* 242: 715-723, 1988.
- KORENOVSKY, A.; LAEV, L.; MUKHERJEE, S. & MAHADIK, S. P. Quantitative analyses of plasma cholinesterase isozymes in haloperidol treated rats. *Biol. Psychiatry.* 27: 871-883, 1990.
- KRUK, Z. L. & ZARRINDAST, M. R. Mazindol anorexia is mediated by activation of dopaminergic mechanisms. *Br. J. Pharmacol.* 58: 367-372, 1976.

- KUBO, T.; FUKUDA, K.; MIKAMI, A.; MAEDA, A.; TAKAHASHI, H.; MISHIMA, M.; HAGA, T.; HAGA, K.; ICHIYAMA, A.; KANGAWA, K.; KOJIMA, M.; MATSUO, H.; HIROSE, T. & NUMA, S. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323: 411-416, 1986a.
- KUBO, T.; MAEDA, A. & SUGIMOTO, K. Primary structure of porcine cardiac muscarinic acetylcholine receptor deduced from the cDNA sequence. *FEBS Lett* 209: 367-372, 1986b.
- KUBOTA, Y.; INAGAKI, S.; SHIMADA, S.; KITO, S.; ECKENSTEIN, F. & TOKYAMA, M. Cholinergic neurons receive direct synaptic inputs from dopaminergic axons. *Brain Res.* 413: 179-184, 1987.
- KUCZENSKI, K. & LEITH, N. J. Chronic amphetamine: Is dopamine a link in or a mediator of the development of tolerance and reverse tolerance? *Pharmacol. Biochem. Behav.* 15: 405-413, 1981.
- LACEY, M. G.; MERCURI, N. B. & NORTH, R. A. Dopamine acts on D2 receptors to increase potassium conductance in neurones of the rat substantia nigra zona compacta. *J. Physiol. Lond.* 392: 397-416, 1987.
- LACEY, M. G. Towards Understand Dopamine. *Seminar Neurosci.* 1: 137-143, 1989.
- LAI, J.; MEI, L.; ROESKE, W. R.; CHUNG, F.-Z.; YAMAMURA, H. I. & VENTER, J. C. The cloned murine M1 muscarinic receptor is associated with the hydrolysis of phosphatidylinositols in transfected murine B82 cells. *Life Sci.* 42: 2489-2502, 1988.
- LAI, J.; NUNAN, L.; WAITE, S. L.; MA, S.-W.; BLOOM, J. W.; ROESKE, W. R. & YAMAMURA, H. I. Chimeric M1/M2 muscarinic receptors: correlation of ligand selectivity and functional coupling with structural modifications. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 262: 173-180, 1992.
- LAI, J.; WAITE, S. L.; BLOOM, J. W.; YAMAMURA, H. I. & ROESKE, W. R. The M2 muscarinic acetylcholine receptors are coupled to multiple signaling pathways via pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide regulatory proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 258: 938-944, 1991.

- **LANGER, S. Z. & ARBILLA, S.** The amphetamine paradox in dopaminergic neurotransmission. *Trends Pharmacol. Sci.* 4: 387-390, 1981.
- **LAZARENO, S.; BUCKLEY, N. J. & ROBERTS, F. F.** Characterization of muscarinic M4 binding sites in rabbit lung, chicken heart, and NG 108-15 cells. *Mol. Pharmacol.* 38: 805-815, 1990.
- **LEFF, S. E. & CREESE, I.** Interactions of dopaminergic agonists and antagonists with dopaminergic D3 binding sites in rat striatum: evidence the 3H-dopamine can label a high affinity agonist-binding state of the D1 dopamine receptor. *Mol. Pharmacol.* 27: 184-192, 1985.
- **LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B. & TAYLOR, P.** Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic motor nervous system. In: Gilman, A. G.; Ruddon, R. W.; Molinoff, P. B.; Limbird, L. E. & Hardman, J. G.; eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: MacGraw-Hill, cap 6: 105-140, 1996.
- **LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B. & TAYLOR, P.** The autonomic and somatic motor nervous systems. In: Gilman, A. G.; Ruddon, R. W.; Molinoff, P. B.; Limbird, L. E. & Hardman, J. G.; eds. *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: MacGraw-Hill, 105-139, 1996.
- **LEHMANN, J. & LANGER, S. Z.** The striatal cholinergic interneuron: synaptic target of dopaminergic terminals? *Neurosci.* 10: 1105-1120, 1983.
- **LE MOINE, C.; NORMAND, E. & BLOCK, B.** Phenotypical Characterization of the Rat Striatal Neurons Expressing the D1 Dopamine Receptor Gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 4205-4209, 1991.
- **LE MOINE, C.; TISON, F. & BLOCK, B.** D2 dopamine receptor gene expression by cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 117: 248-252, 1990.
- **LEVIN, E. D.; MCGURK, S. R.; ROSE, J. E. & BUTCHER, L. L.** Cholinergic-dopaminergic interactions in cognitive performance. *Behav. Neural. Biol.* 54(3): 271-299, 1990.
- **LEVITZKI, A. P.** *Physiol. Rev.* 66: 819-842, 1986.

- LIAO, C.-F.; THEMMEN, A. P. N.; JOHO, R.; BARBERIS, C.; BIRNBAUMER, M. & BIRNBAUMER, L. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 7328-7337, 1989.
- LIPKIN, D.; COOK, W. H.; MARKHAM, R. *J. Am. Chem. Soc.* 81: 6198-6203, 1959.
- LIPTON, J. W.; OLSEN, R. W. & ELLISON, G. D. Length of continuous cocaine exposure determines the persistence of muscarinic and benzodiazepine receptor alterations. *Brain Res.* 679: 378-385, 1995.
- LIM, D. K.; YU, Z. J.; HOSKINS, B.; ROCKHOLD, R. W. & HO, I. K. Effects of acute and subacute cocaine administration on the CNS dopaminergic system in Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats: II. dopamine receptors. *Neurochem. Res.* 15(6): 621-627, 1990.
- LONG, P. W. *Internet Mental Health* (www, mentathealth.com) copyright © 1995-1996.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDALL, R. J. Protein measurement with follin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-75, 1951.
- MAHADIK, S. P.; HELJO, L.; KORENOVSKY, A. & KARPIAK, S. E. Haloperidol alters rat cholinergic system: Enzymatic and morphological analysis. *Biol. Psychiatry* 24: 199-217, 1988a.
- MAHADIK, S. P. & MUKHERJEE, S. Monosialoganglioside contreatment prevents haloperidol treatment-associated loss of cholinergic enzymes in rat brain. *Biol. Psychiatry* 38: 246-254, 1995.
- MAJOCHA, R. & BALDESSARINI, R. J. Tolerance to an anticholinergic agent is paralleled by increase binding to muscarinic receptor in rat brain and increased behavioral response to a centrally active cholinomimetic. *Life Sci.* 35: 2247-55, 1984.
- MALDONADO, R.; ROBLEDO, P.; CLOVER A. J.; CAINE S. B. & KOOB, G. F. D1 dopamine receptors in the nucleus accumbens modulate cocaine self-administration in the rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45: 239-242, 1993.

- MANSOUR, A.; MEADOR-WOODRUFF, J.; BUNZOW, J.; CIVELLI, O.; AKIL, H. & WATSON, S. Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J. Neurosci.* 10: 2587-2600, 1990.
- MARKIS, K. J. & FISHMAN, E. B. Presynaptic acetylcholinesterase. *Trends in Pharmacol. Sci.* 6: 387-388, 1985.
- MATSUBARA, S.; MATSUBARA, R.; KUSUMI, T. & YAMASHITA, I. Dopamine D1, D2 and serotonin₂ receptor occupation by typical and atypical antipsychotic drugs *in vivo*. *J. Pharm. Exp. Ther.* 265: 498-508, 1993.
- MATTEI, R. & CARLINI, E. A. Mazindol: anorectic and behavioral effects in female rats. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 330: 279-287, 1995.
- McGEER, P. L. & McGEER, E. G. Cholinergic enzyme systems in Parkinson's disease. *Arch. Neurol. (Chic)* 25: 265-268, 1971.
- McGEER, P. L.; HATTORI, T.; SINGH, V. K. & McGREER, E. G. Cholinergic systems in extrapyramidal function. In: Yahr, M. D., *The basal ganglia*, New York: Raven Press, 213-226, 1976.
- McLENNAN, H. & YORK, D. H. The action of dopamine on neurons of caudate nucleus. *J. Physiol.* 189: 393-400, 1967.
- MEADOR-WOODRUFF, J. H.; MANSOUR, A.; GRANDY, D. K.; DAMASK, S. P.; CIVELLI, O. & WATSON, S. J. Distribution of D5 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Neurosci. Lett.* 145: 209-212, 1992.
- MEADOR-WOODRUFF, J. H.; MANSOUR, A. & HEALTY, D. J. Comparison of the distributions of D1 and D2 dopamine receptor mRNAs in rat brain. *Neuropsychopharmacol.* 5: 231-242, 1991.
- MEI, L.; LAI, J.; ROESKE, W. R.; FRASER, C. M.; VENTER, J. C. & YAMAMURA, H. I. Pharmacological characterization of the M1 muscarinic receptors expressed in murine fibroblast B82 cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 680-686, 1991.
- MELLO, N. K.; MENDELSON, J. H.; BREE, M. P. & LUKAS, S. E. Bruprenorphine suppress cocaine self-administration by rhesus monkeys. *Science* 245: 859-862, 1989.

- MELTZER, H. Y.; MATSUBARA, S. & LEE, J.C. Classification of typical and atypical antipsychotic drugs on the basis of dopamine D1- and D2- and serotonin pKi values. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 251: 238-246, 1989.
- MEMO, M.; PRADHAM, S. & HANBAUER, I. Cocaine-induced supersensitivity of striatal dopamine receptors: role of endogenous calmodulin. *Neuropharmacol.* 20: 1145-1150; 1981.
- MENEGUZ, A.; BISSO, G. M. & MICHALEK, H. Age-related effects in acetylcholinesterase and its forms in various brain areas of rats. *Neurochem. Res.*, 17(8): 785-790, 1992.
- MENGOD, G.; MARTINEZ-MIR, M. I.; VILARO, M. T. & PALACIOS, J. M. Localization of the mRNA for the dopamine D2 receptor in the rat brain by *in situ* hybridization histochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8560-8564, 1989.
- MESULAM, M. M. Structure and function of cholinergic pathways in the cerebral cortex, limbic system, basal ganglia, and thalamus of the human brain. In: Bloom, F. E. & Kupfer, D. J., *Psychopharmacol.*, New York: Raven Press, 135-146, 1995.
- MESULAM, M. M. & GEULA, C. Acetylcholinesterase-rich neurons of human cerebral cortex: cytoarchitectonic and ontogenetic patterns of distribution. *J. Comp. Neurol.* 306: 193-220, 1991.
- MISSALE, C.; NISOLE, E.; LIBERINE, P.; RIZZONELLI, P.; MEMO, M.; BUONAMICI, M.; ROSSI, A. & SPANS, P. F. Repeated reserpine administration up-regulates the transduction mechanism of D1 receptors without changing the density of 3H-SCH 23390 binding. *Brain Res.* 483: 117-122, 1989.
- MONSMA JR., F. J.; MAHAN, L. C.; MCVITTIE, L. D.; GERFEN, C. R. & SIBLEY, D. R. Molecular cloning and expression of a D1 dopamine receptor linked to adenylyl cyclase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 6723-6727, 1990.
- MORELLI, M. & CHIARA, G. D. Catalepsy induced by SCH 23390 in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 117: 179-185, 1985.
- MUNEMURA, M.; COTE, T. E.; TSURUTA, K.; ESKAY, R. L. & KEBABIAN, J. W. The dopamine receptor in the intermediate lobe of the rat pituitary gland: pharmacological characterization. *Endocrinol.* 107: 1676-1683, 1980.

- MUNKVAD, I.; PAKKENBERG, H. & RANDRUP, A. Aminergic systems in basal ganglia associated with stereotyped hyperactive behaviour and catalepsy. *Brain Behav. Evol.* 1: 89-100, 1968.
- NAJLERAHIM, A.; BARTON, A. J. L.; HARRISON, P. J.; HEFFERNAN, J. & PEARSON, R. C. A. Messenger RNA encoding the D2 dopaminergic receptor detected by *in situ* hybridization histochemistry in rat brain. *FEBS Lett*, 255: 335-339, 1989.
- NAKAGAWA-YAGI, Y.; SAITO, Y.; TAKADA, Y.; & TAKAYAMA, M. Carbachol enhances forskolin-stimulated cyclic AMP accumulation via activation of calmodulin system in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 178: 116-123, 1991.
- NAPPO, S. A. Consumo de anorexígeno tipo-anfetamina (dietilpropiona, fenproporex, mazindol) e de fenfluramina no Brasil: prejuízo ou benefício para a saúde. *J. Bras. Psiqu.* 41: 417-421, 1992.
- NG, J. P.; HUBERT, G. W. & JUSTICE JR., J. B. Increased stimulated release and uptake of dopamine in *nucleus accumbens* after repeated cocaine administration as measured by *in vivo* voltametry. *J. Neurochem.* 56: 1485-1492, 1991.
- NIEMEGERS, C. J. E. & JANSEN, P. A. J. A systematic study of the pharmacological activities of dopamine antagonists. *Life Sci.* 24: 2201-2216, 1979.
- OHNO, M.; YAMAMOTO, T. & WATANABE, S. Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 45: 89-93, 1993.
- O'MALLEY, K. L.; HARMON, S.; TANG, L. & TODD, R. D. The rat dopamine D4 receptor: sequence, gene, structure and demonstration of expression in the cardiovascular system. *New Biol.* 4: 137-146, 1992.
- OWEN, F.; CROW, T. J.; POULTER, M.; CROSS, A. J.; LONGDEN, A. & RILEY, G. J. Increased dopamine receptor sensitivity in schizophrenia. *Lancet II*, 223-226, 1978.
- PARSON, L. H.; SMITH, A. D. & JUSTICE JR., J. B. Basal extracellular dopamine is decreased in the rat *nucleus accumbens* during abstinence from cocaine. *Synapse* 9: 60-65, 1991.

- **PEDATA, F.; SORBI, S. & PEPEU, G.** Choline high-affinity uptake and metabolism and choline acetyltransferase activity in the *striatum* of rats chronically treated with neuroleptics. *J. Neurochem.* 35: 606-611, 1980.
- **PEDDER, E. K.; EVELEIGH, P.; POYNER, D.; HULME, E. C. & BIRDSALL, N. J. M.** Modulation of the structure-binding relationships of antagonists for muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *Br. J. Pharmacol.* 103: 1561-1567, 1991.
- **PERALTA, E. G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; SMITH, D. H.; RAMACHANDRAN, J. & CAPON, D. J.** Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. *EMBO J.* 6: 3923-3929, 1987a.
- **PERALTA, E. G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J. W.; RAMACHANDRAN, J. & CAPON, D. J.** Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. *Nature* 334:434-437, 1988.
- **PERALTA, E. G.; WINSLOW, J. W.; PETERSON, G. L.; SMITH, D. H.; ASHKENAZI, A.; RAMACHANDRAN, J.; SCHIMERLIK, M. I. & CAPON, D. J.** Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. *Science* 236: 600-605, 1987b.
- **PERIS, J. & ZAHNISER, N. R.** Persistent augmented dopamine release after acute cocaine requires dopamine receptor activation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 71-76, 1989.
- **PERIS, J.; BOYSON, S. J.; CASS, W. A.; CURELLA, P.; DWOSKIN, L. P.; LARSON, G.; LIN, L.-H.; YASUDA, R. P. & ZAHNISER, N. R.** Persistence of neurochemical changes in dopamine systems after repeated cocaine administration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 38-44, 1990.
- **PEROUTKA, S. J. & SNYDER, S. H.** Relationship of neuroleptic drug effects at brain dopamine, serotonin, alpha adrenergic and histamine receptors to clinical potency. *American J. of Psychiatry* 137: 1518-1522, 1980.
- **PETTIT, H. O.; PAN, H. T.; PARSON, L. H. & JUSTICE JR., J. B.** Extracellular concentrations of cocaine and dopamine are enhanced during chronic cocaine administration. *J. Neurochem.* 55: 798-804, 1990.

- **PICH, E. M.; BENFENATI, F.; FARABEGOLI, C.; FUXE, K.; MELLER, E.; ARONSSON, M.; GOLDSTEIN, M. & AGNATI, L. F.** Chronic haloperidol affects striatal D2-dopamine receptor reappearance after irreversible receptor blockade. *Brain Res.* 435: 147-152, 1987.
- **PINKAS-KRAMARSKI, R.; EDLEMAN, R. & STEIN, R.** Indications for selective coupling to phosphoinositide hydrolysis or to adenylate cyclase inhibition by endogenous muscarinic receptor subtypes M3 and M4 but not by M2 in tumor cell lines. *Neurosci. Lett.* 108: 335- 340, 1990.
- **PLAUT, M.** *Advances in cyclic nucleotide research.*, 12: 161. In: HAMET, P. & SANDS, H. New York: Raven Press, 1980.
- **POGUN, S.; SCHEFFEL, U. & KUCHAR, M. J.** Cocaine displaces [3H]WIN 35428 binding to dopamine uptake sites *in vivo* more rapidly than mazindol or GBR 12909. *Eur. J. Pharmacol.* 198: 203-205, 1991.
- **PORCEDDU, M. L.; GIORGI, O.; ONGINI, E.; MELE, S. & BIGGIO, G.** 3H-SCH 23390 binding sites in rat substantia nigra: evidence for a presynaptic localization and innervation by dopamine. *Life Sci.* 39: 321-328, 1986.
- **POST, R. M. & CONTEL, N. R.** Human and animal studies of cocaine: implications for development of behavioral pathology. In: Creese, I., ed. *Stimulants: Neurochemical, Behavioral and Clinical Perspectives.* New York: Raven Press, 169-203, 1983.
- **POIRIER, L. J. & SOURKES, T. L.** Influence of the substantia nigra on the catecholamine content of the striatum. *Brain. Res.* 88: 181-192, 1965.
- **PULVIRENTI, L.; MALDONADO-LOPES, R. & KOOB, G. F.** NMDA receptors in the nucleus accumbens modulate intravenous cocaine but not heroin self-administration in the rat. *Brain Res.* 594: 327-330, 1992.
- **PYCOCK, C.; MILSON, J.; TARSY, D. & MARSDEN, C. D.** The effects of manipulation of cholinergic mechanisms on turning behavior in mice with unilateral destruction of the nigro-neostriatal dopaminergic system. *Neuropharmacol.* 17: 175-183, 1978.
- **RAITERI, M.; MARCHI, M. & PAUDICE, P.** Presynaptic muscarinic receptors in the central nervous system. In: S. Kalsner and T. Westfall, *Presynaptic receptors and the question of*

autoregulation of neurotransmitter release, 604: 113-129, Annals of New York Academy of Sciences, New York, 1990.

- **RANDRUP, A. & MUNKVAD, I.** Stereotyped behaviour produced by amphetamine in several animal species and man. *Psychopharmacol.* 11: 300-310, 1967.
- **RANG, H. P. & DALE, M. M.** Transmissão química e ação de drogas no sistema nervoso central. In: Rang, H. P. & Dale, M. M. *Farmacologia*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 23, p. 355, 1993.
- **RANG, H. P. & DALE, M. M.** Transmissão colinérgica. In: Rang, H. P. & Dale, M. M. *Farmacologia*, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.7, p. 97, 1993.
- **REINER, P. B.; & FIBIGER, H. C.** Functional heterogeneity of central cholinergic systems. In: Bloom, F. E. & Kupfer, D. J. *Psychopharmacol.* cap 10: 147-153, New York: Raven Press, Ltda, 1995.
- **RICHELSON, E.** Cholinergic transduction. In: Bloom, F. E. & Kupfer, D. J. *Psychopharmacol.* cap 11: 125-134, New York: Raven Press, Ltda., 1995.
- **RISNER, M. E. & SILCOX, D. L.** Psychostimulant self-administration by beagle dogs in a progressive-ratio paradigm. *Psychopharmacol.* 75: 25, 1981.
- **RITZ, M. C.; LAMB, R. J.; GOLDBERG, S. R. & KUCHAR, M. J.** Cocaine receptors on dopamine transporters are related to self-administration of cocaine. *Science* 237: 1219-1223, 1987.
- **ROBERTS, D. C. S.; LOH, E. A. & VICKERS, G.** Self-administration of cocaine on a progressive ratio schedule in rats: dose-response relationship and effect of haloperidol pretreatment. *Psychopharmacol.* 97: 535-538, 1989.
- **ROBINSON, T. E. & BECKER, J. B.** Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: a review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Res. Rev.* 11: 157-198, 1986.
- **ROSS, S. B.** The central stimulatory action of inhibitors of the dopamine uptake. *Life Sci.* 24: 159-168, 1979.
- **SAFER, D. J. & ALLEN, R. P.** The central effects of scopolamine in man. *Biol. Psychiatry* 3: 347-355, 1971.

- **SCAPAGNINI, U.** Sulpirida and Other Benzamides In: Spano, P. F.; Trabucchi, M.; Corsini, G. U. & Gessa, G. L., *Brain Research Foundation*, Milan, 193-205, 1979.
- **SCATTON, B.** Further Evidence for the Involvement of D2 but not D1 Receptors in Dopaminergic Control of Striatal Cholinergic Transmission. *Life Sci.* 31: 2883-2890, 1982a.
- **SCATTON, B.** Effect of Dopamine Agonists and Neuroleptic Agents on Striatal Acetylcholine Transmission in the Rat: Evidence Against Dopamine Receptor Multiplicity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220: 197-202, 1982b.
- **SHEEL-KRUGER, J.** New aspects on the functional role of ACh in basal ganglia. Interactions with other transmitter. In: Singh M.M., *Central Cholinergic Mechanisms and Adaptive Dysfunction*. New York: Plenum Press, 105-140, 1985.
- **SCHENK, S.; VALADEZ, A. & MCNAMARA, C.** Development and expression of sensitization to cocaine's reinforcing properties: role of NMDA receptors. *Psychopharmacol.* 111: 332-338, 1993.
- **SCHULTZ, G.; HARDMAN, J. G.; SCHULTZ, K.; BAIRD, C. E. & SUTHERLAND, W.** The importance of calcium ions for the regulation of guanosine 3', 5' - monophosphate levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3889-3893, 1973.
- **SEEMAN, P.** Brain dopamine receptors. *Pharmacol. Rev.* 32: 229-313, 1981.
- **SEEMAN, P.** Brain dopamine receptors in schizophrenia and tardive dyskinesia. In: Casey, D. E.; Chases, T. N.; Christensen, A. V.; Gerlach, J., *Dyskinesia: research and treatment.*, New York Berlin, Heidelberg, Tokyo: Springer , 2-8, 1985.
- **SEEMAN, P.; BZOWEJ, N. H.; GUAN, H. C.; BERGERON, C.; REYNOLDS, G. P.; BIRD, E. D.; RIEDERER, P.; JELLINGER, K. & TOURTELLOTTE, W. W.** Human Brain D1 and D2 Dopamine Receptors in Schizophrenia, Alzheimer's Parkinson's and Huntington's Disease. *Neuropsychopharmacol.* 1: 5-15, 1987.
- **SEEMAN, P. & VAN TOL, H. H. M.** Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 15: 264-270, 1994.
- **SEGAL, D. S. & SCHUCKIT, M.** Animal models of stimulant-induced psychosis. In: Creese, I. ed. *Stimulants: Neurochemical*,

behavioral and clinical perspectives. New York: Raven Press, 131-167, 1983.

- **SEIDEN, L. S.; SABOL, K. E. & RICAURTE, G. A.** Amphetamine effects on catecholamine systems and behavior. *Annu Rev. Pharmacol.* 33: 639-677, 1993.
- **SEMBA, K.** The cholinergic basal forebrain: a critical role in cortical arousal. In: Napier, T. C.; Kalivas, P. W. & Hanin, I. *In the basal forebrain: Anatomy to function*, 197-218, New York: Plenum Press, 1992.
- **SETLER, P. E.; SARAU, H. M.; ZERKLE, C. L. & SAUNDERS, H. L.** The central effects of a novel dopamine agonist. *Eur. J. Pharmacol.* 50: 419-430, 1978.
- **SETHY, V. H.** Effects of chronic treatment with neuroleptics on striatal acetylcholine concentration. *J. Neurochem.* 27: 325-326, 1976.
- **SETHY, V. H. & WENGER, D.** Effect of dopaminergic drugs on striatal acetylcholine concentration. *J. Pharmacy pharmacol.* 37: 73-74, 1985.
- **SHANNON, H. E. & PETERS, S. C.** A comparison of the effects of cholinergic and dopaminergic agents on scopolamine-induced hyperactivity in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255(2): 549-553, 1990.
- **SHARKEY, J. M.; RITZ, J.; SCHENDEN, R.; HANSON, G. & KUCHAR, M.** Cocaine inhibits muscarinic cholinergic receptors in heart and brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246: 1048-1052, 1988.
- **SHIMIZU, N.; TAKE, S.; HORI, T. & OOMURA, Y.** Hypothalamic microdialysis of mazindol causes anorexia with increase in synaptic serotonin in rats. *Physiol. and Behav.* 49: 131-134, 1991.
- **SHUI, Z; BOYETT, M. R.; ZANG, W. J.; HAGA, T. & KAMEYAMA, K.** Receptor kinase-dependent desensitization of the muscarinic K⁺ current in rat atrial cells. *J. Physiol.* 487: 359-366, 1995.
- **SIGALA, S.; RIZZONELLI, P.; ZANELLI, E.; FORGIONI, A.; MISSALE, C. & SPANO, P. F.** Low doses of L-superide down-regulate striatal and cortical dopamine receptors and β -adrenoceptors. *Eur. J. Pharmacol.* 199: 247-253, 1991.

- **SINGH, M. M. & KAY, S. R.** Pharmacology of central cholinergic mechanisms and schizophrenia disorder. In: Singh, M. M. *Central Cholinergic Mechanisms and Adaptive Dysfunction*. New York: Plenum Press, 247-308, 1985.
- **SITARAM, N.; NURNBERGER, J. I.; GERSHON, E. S. & GILLIN, J. C.** Faster cholinergic REM sleep induction in euthymic patients with primary affective illness. *Science* 208: 200-202, 1980.
- **SMITH, R. C. & DAVIS, J. M.** Behavioral evidence for supersensitivity after administration of haloperidol, clozapine and thioridazine. *Life Sci.* 19: 725-732, 1976.
- **SOKOLOFF, P.; GIROS, B. & SCHWARTZ, J. C.** Novel dopamine receptors half a decade later. *TIPS*, 16: 270-275, 1995.
- **SOKOLOFF, P.; GIROS, B.; MARTRES, M. P.; BOUTHENET, M. L. & SCHWARTZ, J. C.** Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 347: 146-151, 1990.
- **SONSALLA, P. K.; MANZINO, L. & HEIKKILA, E.** Interactions of D1 and D2 dopamine receptors on the ipsilateral vs contralateral side in rats with unilateral lesions of the dopaminergic nigrostriatal pathway. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 247: 180-185, 1988.
- **SPANO, P. F.; GOVONI, S. & TRABUCCHI, M.** Studies on the pharmacological properties of dopamine receptors in various areas of the central nervous system. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 19: 155-165, 1978.
- **SPANO, P. F.; GOVONI, S.; UZUMAKI, H.; BOSIO, A.; MEMO, M.; LUCHI, L.; CARRUBA, M. O. & TRABUCCHI, M.** Stimulation of D2 dopamine receptors by dopaminergic ergot alkaloids: studies on the mechanism of action, In: *aging, brain and ergot alkaloids*. New York: Raven Press, p.165, 1983.
- **SPANO, P. F.; STEFANINI, E.; TRABUCCHI, M. & FRESIA, P.** Sulpirida and Other Benzamides, In: Spano, P. F.; Trabucchi, M.; Corsini, G. U. & Gessa, G. L. *Italian Brain Research Foundation*, Milan, 11-31, 1979.
- **STADLER, H.; LLOYD, K. G.; GADEA-CIRIA & BARTHOLINI, G.** Enhanced striatal acetylcholine release by

chlorpromazine and its reversal by apomorphine. *Brain Res.* 55: 476-480, 1973.

- **STARR, M. S. & STARR, B. S.** Behavioral synergism between the dopamine agonist SKF 38393 and LY 171555 in dopamine-depleted mice: antagonism by sulpirida reveals only stimulant postsynaptic D2 receptors. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 33: 41-44, 1989.
- **STEWART, J. & VEZINA, P.** Microinjections of SCH-23390 into the ventral tegmental area and substantia nigra pars reticulata attenuate the development of sensitization to the locomotor activating effects of systemic amphetamine. *Brain Res.* 495: 401-406, 1989.
- **STOOF, J. C.; DRUKARCH, B.; DE BOER, P. & WESTERINK, B. H. C.** *In vitro* and *in vivo* acetylcholine release from rat striatum as a function paradigm of signal transduction via a D2 dopamine receptor. *Neurochem. Int.* 20: 201S- 205S, 1992.
- **STOOF, J. C. & KEBABIAN, J. W.** Opposing roles for D1 and D2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature* 294: 366-368, 1981.
- **STOOF, J. C. & VERHEIJDEN, P. D. H. M.** D2 receptor stimulation inhibits cyclic AMP formation brought about by D1 receptor stimulation in rat neostriatum but not nucleus accumbens. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 205-206, 1986.
- **SUNAHARA, R. K.; GUAN, H. C. & O'DOWD, B. F.** Cloning of the gene for a human dopamine D5 receptor with higher affinity for dopamine than D1. *Nature* 350: 614-619, 1991.
- **SUNDBERG, D. J.** Chemical Messenger Systems. In: Conn, P. M. *Neuroscience in Medicine*, Philadelphia: J. B. Lippincott Company, 403-426, 1994.
- **SUTHERLAND, E. W.; ROBINSON, G. A. & BUTCHER, R. W.** *Circulation*, 37: 279-306, 1968.
- **SUTHERLAND, E. W. & RALL, T. W.** *J. Am. Chem. Soc.* 79: 3608, 1957.
- **TACHADO, S. D.; VIRDEE, K.; AKHTAR, R. A. & ABDEL-LATIF, A. A.** M3 muscarinic receptors mediate an increase in both inositol phosphate product and cyclic AMP

formation in dog iris sphincter smooth muscle. *J. Ocul. Pharmacol.* 10: 137-147, 1994.

- TAN, X. X. & COSTA, L. G. Inhibition of muscarinic receptor-stimulated phosphoinositide metabolism by cocaine, norcocaine and cocaethylene in rat brain. *Dev. Brain Res.* 79: 132-135, 1994.
- TANDO, R.; DEQUARDO, J. R.; GOODSON, J.; MANN, N. A. & GREDEN, J. F. Effect of anticholinergics on positive and negative symptoms in schizophrenia. *Psychopharmacol. Bull.* 28: 297-302, 1992.
- TANDO, R.; SHIPLEY, J. E.; GREDEN, J. F.; MANN, N. A.; EISNER, W. H. & GOODSON, J. Muscarinic cholinergic hyperactivity in schizophrenia-relationship to positive and negative symptoms. *Schizophrenia Res.* 4: 23-30, 1991.
- TAKEYASU, K.; UCHIDA, S.; NOGUCHI, Y.; FUJITA, N.; SAITO, N.; HATA, F. & YOSHIDA, H. Changes in brain muscarinic acetylcholine receptors and behavioral responses to atropine and apomorphine in chronic atropine-treated rats. *Life Sci.* 25: 585-592, 1979.
- TATEISHI, K.; FUNAKOSHI, A.; KITAYAMA, N. & MATSUOKA, Y. Interaction between phosphoinositide turnover system and cyclic AMP pathway for the secretion of pancreastatin an somatostatin from QGP-1N cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185: 1041-1047, 1992.
- TECOTT, L. H.; KWONG, L. L.; UHR, S. & PEROUTKA, S. J. Differential modulation of dopamine D2 receptors by chronic haloperidol, nitrendipine and pimozida. *Biological Psychiatry* 21: 1114-1122, 1986.
- TERAJ, M.; HIOAKA, K. & NAKAMURA, Y. Comparison of 3H-YM-09151-2 with 3H-spiperone and 3H-raclopride for dopamine receptor binding to rat striatum. *Eur. J. Pharmacol.* 173(2): 177-182, 1989.
- TERWILLIGER, R. Z.; BEITNER-JOHNSON, D.; SEVARINO, K. A.; CRAIN, S. M. & NESTLER, E. J. A general role for adaptations in G-proteins and the cyclic AMP system in mediating the chronic of morphine and cocaine on neuronal function. *Brain Res.* 548: 100-110, 1991.
- THORNBURG, J. E. & MOORE, K. E. Inhibition of anticholinergic drug-induced locomotor stimulation in mice by alpha-methyltyrosine. *Neuropharmacol.* 12: 1179-1185, 1973.

- **TIBERI, M.; JARVIE, K. R. & SILVIA, C.** Cloning molecular characterization and chromosomal assignment of a gene encoding a second D1 dopamine receptor subtype: differential expression pattern in rat brain compared with the D1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7491-7495, 1991.
- **TRABUCCHI, M.; CHENEY, K. M.; RACAGNI, G. & COSTA, E.** Involvement of cholinergic mechanisms in the action of chlorpromazine. *Nature* 249: 664-666, 1974.
- **TSURUTA, K.; FREY, E. A.; GREWE, C. W.; COTE, T. E.; ESKAY, R. L. & KEBABIAN, J. W.** Evidence that LY-141865 specifically stimulates the D2 receptor. *Nature* 292: 463-465, 1981.
- **TUCEK, S.** Short-term control of the synthesis of acetylcholine. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 60: 59-69, 1993.
- **UHL, G. R.** Neurotransmitter transporters (plus): a promising new gene family. *Trends Neurol. Sci.* 15: 265-268, 1992.
- **UJIKE, H.; ONOUE, T.; AKIYAMA, K.; HAMAMURA, T. & OTSUKI, S.** Effects of selective D1 and D2 dopamine antagonists on development of methamphetamine induced behavioral sensitization. *Psychopharmacol.* 98: 89-92, 1989.
- **UNDIE, A. S. & FRIEDMAN, E.** Differences in the cataleptogenic actions of SCH 23390 and selected classical neuroleptics. *Psychopharmacol.* 96: 311-316, 1988.
- **UNGERSTEDT, U.** Adipsia and aphagia after 6-hydroxydopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. *Acta Physiol. Scand.* 82: 95-122, 1971.
- **USHIJIMA, I.; CARINO, M. A. & HORITA, A.** Involvement of D1 and D2 dopamine system in the behavioral effects of cocaine in rats. *Pharmacol. Biochem. Behavior* 52: 737-741, 1995.
- **USHIJIMA, I.; MIZUKI, Y. & YAMADA, M.** The mode of action of bromocriptine following pretreatment with reserpine and alfa-methyl-p-tyrosine in rats. *Psychopharmacol.* 95: 29-33, 1988a.
- **USHIJIMA, I.; MIZUKI, Y. & YAMADA, M.** Multifocal sites of action involved in dopaminergic-cholinergic neuronal interactions in yawning. *Psychopharmacol.* 95: 34-37, 1988b.

- VALLAR, L.; MUCA, C.; MAGNI, M.; ALBERT, P.; BUNZOW, J.; MELDOLESI, J. & CIVELLI, O. Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types: stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in Ltk⁻ fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca⁺⁺ concentration decrease in GH₄C₁ cells. *J. Biol. Chem.* 265: 1032-1036, 1990.
- VAN TOL, H. H. M.; BUNZOW, J. R. & GUAN, H. C. Cloning of a human dopamine D4 receptor gene with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614, 1991.
- VEZINA, P. & STEWART, J. The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. *Brain Res.* 499: 108-120, 1989.
- WAINER, B. H. & MESULAM, M. M. Ascending cholinergic pathways in the rat brain. In: Steriade, M.; Biesold, D., *Brain cholinergic systems*, New York: Oxford University Press, 65-119, 1990.
- WANG, H. Y.; ZHOW, L. W.; FRIEDMAN, E. & WEISS, B. Differential regulation of release of acetylcholine in the striatum in mice following continuous exposure to selective D1 and D2 dopaminergic agonists. *Neuropharmacol.* 32: 85-91, 1993.
- WARHURST, G.; FOGG, K.E.; HIGGS, N.B.; TONGE, A.; & GRUNDY, J. Ca⁺² mobilising agonists potentiate forskolin an VIP stimulated cAMP production in human colonic cell line, HT29-cl.19A: role of [Ca⁺²], and protein kinase C. *Cell Calcium* 15: 162-174, 1994.
- WARPMAN, U.; ZHANG, X. & NORDBERG, A. Effect of tacrine on *in vivo* release of dopamine and its metabolites in the striatum of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 917-922, 1996.
- WATLING, K. J. & DOWLING, J. E. Dopaminergic mechanisms in the teleost retina. I. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in homogenates of carp retina; effects of agonists, anatagonists and ergots. *J. Neurochem.* 36: 559-568, 1981.
- WATSON, E. L.; SINGH, J. C.; McPHEE, C.; BEAVO, J. & JACOBSON, K.L. Regulation of cAMP metabolism in mouse parotid gland by cGMP and calcium. *Mol. Pharmacol.* 38: 547-553, 1990.

- VALLAR, L.; MUCA, C.; MAGNI, M.; ALBERT, P.; BUNZOW, J.; MELDOLESI, J. & CIVELLI, O. Differential coupling of dopaminergic D2 receptors expressed in different cell types: stimulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in Ltk⁻ fibroblasts, hyperpolarization, and cytosolic-free Ca⁺⁺ concentration decrease in GH₄C₁ cells. *J. Biol. Chem.* 265: 1032-1036, 1990.
- VAN TOL, H. H. M.; BUNZOW, J. R. & GUAN, H. C. Cloning of a human dopamine D4 receptor gene with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Nature* 350: 610-614, 1991.
- VEZINA, P. & STEWART, J. The effect of dopamine receptor blockade on the development of sensitization to the locomotor activating effects of amphetamine and morphine. *Brain Res.* 499: 108-120, 1989.
- WAINER, B. H. & MESULAM, M. M. Ascending cholinergic pathways in the rat brain. In: Steriade, M.; Biesold, D., Brain cholinergic systems, New York: Oxford University Press, 65-119, 1990.
- WANG, H. Y.; ZHOW, L. W.; FRIEDMAN, E. & WEISS, B. Differential regulation of release of acetylcholine in the striatum in mice following continuous exposure to selective D1 and D2 dopaminergic agonists. *Neuropharmacol.* 32: 85-91, 1993.
- WARHURST, G.; FOGG, K.E.; HIGGS, N.B.; TONGE, A.; & GRUNDY, J. Ca⁺² mobilising agonists potentiate forskolin an VIP stimulated cAMP production in human colonic cell line, HT29-cl.19A: role of [Ca⁺²], and protein kinase C. *Cell Calcium* 15: 162-174, 1994.
- WARPAN, U.; ZHANG, X. & NORDBERG, A. Effect of tacrine on *in vivo* release of dopamine and its metabolites in the striatum of freely moving rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 917-922, 1996.
- WATLING, K. J. & DOWLING, J. E. Dopaminergic mechanisms in the teleost retina. I. Dopamine-sensitive adenylate cyclase in homogenates of carp retina; effects of agonists, anatagonists and ergots. *J. Neurochem.* 36: 559-568, 1981.
- WATSON, E. L.; SINGH, J. C.; McPHEE, C.; BEAVO, J. & JACOBSON, K.L. Regulation of cAMP metabolism in mouse parotid gland by cGMP and calcium. *Mol. Pharmacol.* 38: 547-553, 1990.

- WHEATLEY, M.; HULME, E. C.; BIRDSALL, N. J. M.; CURTIS, C. A. M.; EVELEIGH, P.; PEDDER, E. K. & POYNER, D. Peptide mapping studies on muscarinic receptors: receptor structure and location of the ligand binding site. *Trends Pharmacol. Sci.*, suppl. Feb: 19-24, 1988.
- WEINER, D. M. & BRANN, M. R. The distribution of a dopamine D2 receptor mRNA in rat brain. *FEBS Lett.* 253: 207-213, 1989.
- WEINER, D. M.; LEVEY, A. I.; SUNAHARA, R. K.; NIZNIK, H. B.; O'DOWD, B. F.; SEEMAN, P. & BRANN, M. R. D1 and D2 dopamine receptor mRNA in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 1859-1863, 1991.
- WESS, J.; BONNER, T. I.; DÖRJE, F. & BRANN, M. R. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. *Mol. Pharmacol.* 38: 517-523, 1990.
- WESTERINK, B. H. C. & DAMSMA, G. Brain microdialysis fails to detect a dopamine-acetylcholine interaction in the basal ganglia. *Trends Pharmacol. Sci.* 10: 262-263, 1989.
- WIENER, H. L. & REITH, M. E. A. Correlation between cocaine-induced locomotion and cocaine disposition in the brain among four inbred strains of mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36: 669-701, 1990.
- WILSON, M. C. & SCHUSTER, C. R. Mazindol self-administration in the rhesus monkey. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 4: 207-210, 1991.
- WOOVERTON, W. L. Effects of a D1 and a D2 dopamine antagonist on self-administration of cocaine and pibredil by rhesus monkeys. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24: 531-535, 1986.
- WOOVERTON, W. L. & VIRUS, R. M. The effects of a D1 and D2 dopamine antagonist on behavior maintained by cocaine or food. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 32: 691-697, 1989.
- XU, M.; MIZOBE, F.; YAMAMATO, T. & KATO, T. Differential effects of M1 and M2 muscarinic drugs on striatal dopamine release and metabolism in freely moving rats. *Brain Res.* 495: 232-242, 1989.

- **YASUDA, R. P.; CIESLA, W.; FLORES, L. R.; WALL, S. J.; LI, M.; SATKUS, S. A.; WEISSTEIN, J. S.; SPAGNOLA, B. V. & WOLFE, B. B.** Development of antisera selective for M4 and M5 muscarinic cholinergic receptors: distribution of M4 and M5 receptors in rat brain. *Mol. Pharmacol.* 43: 149-157, 1992.
- **ZAMBOTTI, F.; CARRUBA, M. O.; BARZAGHI, F.; VICENTINI, L.; GROPETTI, A. & MANTEGAZZA, P.** Behavioral effects of a new nonphenylethylamine anorexigenic agent: mazindol. *Eur. J. Pharmacol.* 36: 405-412, 1976.
- **ZAHNISER, N. R.; PERIS, J.; CURELLA, P.; DWOSKIN, L. P.; O'KEEFE, L. & BOYSON, S. J.** Repeated cocaine administration results in supersensitive nigrostriatal D2 dopamine autoreceptors. In: Beart, P. M.; Woodruff, G. & Jackson, D. M., eds. *Pharmacology and functional regulation of dopaminergic neurons*. London: Macmillan Press, 168-174, 1988.
- **ZEIGLER, S.; LIPTON, J.; TOGA, A. & ELLISON, G.** Continuous cocaine administration produces persisting changes in brain neurochemistry and behavior. *Brain Res.* 552: 27-35, 1991.
- **ZETLER, G.** Cataleptic state and hypothermia in mice, caused by central cholinergic stimulation and antagonized by anticholinergic and antidepressant drugs. *Int. J. Neuropharmacol.* 7: 325-335, 1968.
- **ZHOU, Q. Y.; GRANDY, D. & THAMBI, L.** Cloning and expression of human and rat D1 dopamine receptors. *Nature* 347: 76-80, 1990.
- **ZHOU, L. W.; ZHANG, S.P., CONNELL, T. A. & WEISS, B.** Cholinergic lesions of mouse striatum induced by AF64A alter D2 dopaminergic behavior and reduce D2 dopamine receptors and D2 dopamine receptors mRNA. *Neurochem. Int.* 22: 301-311, 1993.
- **ZILLES, K. & WREE, A.** Cortex: a real and laminar structure. In: PAXINOS, A. ed. *The rat nervous system: Forebrain and midbrain*. Sydney: Academic Press cap. 10(1): 375-415, 1985.