



**Universidade Federal do Ceará**

026649  
R 1260049  
04/04/00

UFC	BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
Nº. R 1260049	
04 / 04 / 00	

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DA  
PENTOXIFILINA SOBRE A LESÃO HIPOCAMPAL E  
DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR GLUTAMATO  
EM RATOS**

**Geanne Matos de Andrade Cunha**

**Fortaleza- Ceara  
1999**

T65K  
615.78  
C9782  
1999

Universidade Federal do Ceará

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DA  
PENTOXIFILINA SOBRE A LESÃO HIPOCAMPAL E DÉFICITS  
DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR GLUTAMATO EM RATOS**

**Geanne Matos de Andrade Cunha**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Profa. Glauce Socorro de Barros Viana

Fortaleza- Ceara  
1999

### FICHA CATALOGRÁFICA

C978 Cunha, Geanne Matos de Andrade

Estudo dos mecanismos envolvidos na ação da pentoxifilina sobre a lesão hipocampal e déficits de memória induzidos por glutamato em ratos/Geanne Matos de Andrade Cunha. – Fortaleza, 1999.

228 f: il.

Orientadora: Profa. Glauce Socorro de Barros Viana.

Tese (Doutorado). Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina.

1. Psicofarmacologia 2. Pentoxifilina 3. Memória 4. Hipocampo 5. Glutamato. I. Título.

CDD 615.78

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca do Centro de Ciências da Saúde da referida Universidade.

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

*Geanne Miquos de Anurue Cunha*

Tese aprovada em 10 de dezembro de 1999

---

*Profa. Dra Glauce Socorro de Barros Viana*  
(Orientadora)

---

*Profa. Dra Veralice Meireles Sales de Bruin*

---

*Profa. Dra Yasco Aracava*

---

*Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa*

---

*Prof. Dr. Ivan Izquierdo*

*“Você precisaria começar a perder a sua memória para, aos poucos perceber que é a memória que faz nossas vidas.*

*Nossa memória é nossa coerência, nossa razão, nosso sentimento e mesmo nossas ações. Sem ela não somos nada.”*

Luis Buñuel, cineasta espanhol

## Dedicatória

*Dedico este trabalho ao Adelino, Lucas e Marina, minha família que amo, pelo apoio e por ter compreendido os momentos de ausência, que não foram poucos.*

## *Agradecimentos*

*À minha orientadora Profa. Glauce de Barros Viana, pelo saber, confiança e estímulo durante a minha Pós-Graduação.*

*Ao Prof. Vietla Rao, um grande cientista, mestre e acima de tudo, amigo de todas as horas.*

*À Profa. Veralice de Bruim, que me ajudou nos experimentos histopatológicos e por sua amizade.*

*À Profa. Yasco Aracava, por ter me acolhido com tanto carinho no seu laboratório e aceitar fazer parte da minha banca examinadora.*

*Ao Prof. Joan Izquierdo que mesmo sem me conhecer, guiou-me no entendimento dos caminhos da memória.*

*Aos Professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, com uma carinho especial para o Prof. Eduardo Torres, cujo conhecimento e caráter me serviram sempre como exemplos.*

*Ao Prof. Odorico de Moraes, por ter aberto o seu laboratório às minhas pesquisas, pela ajuda na confecção dos muitos slides durante minha pós-graduação e sobretudo pelo exemplo de grande homem e amigo.*

*Aos amigos do curso de Pós-Graduação e do Laboratório de Neurofarmacologia, especialmente Juvênia, Vilanir, Ana Eclésia, Flávia,, Augusta, Rômulo.*

*Aos bolsistas Paulo Jorge, Marília, Pablo, Dayse, Renata e Germana, um pouquinho de vocês está nesta tese.*

*Ao amigo Arnaldo Viana, pelo incentivo e ajuda na digitação deste trabalho.*

*Às secretárias Marta, Joana e Sílvia, pela ajuda e amizade.*

*À Artemiza, nossa veterinária, que sempre nos proveu dos animais experimentais permitindo que este trabalho fosse realizado.*

*Ao CNPq pelo suporte financeiro.*



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>xvi</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>xix</b>
<b>RESUMO</b>	<b>xx</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xxii</b>
<b>I - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1. Glutamato	1
1.1 Classificação dos receptores do glutamato	2
1.2 Receptores ionotrópicos	3
1.2.1 Receptor NMDA	3
1.2.2 Receptor Cainato e AMPA	4
1.2.3 Receptores Metabotrópicos	5
<b>2. SÍNTESE E TRANSPORTE DE GLUTAMATO</b>	<b>7</b>
<b>3. PAPEL FISIOLÓGICO DOS RECEPTORES NMDA</b>	<b>10</b>
3.1 Crescimento e diferenciação	10
3.2 Memória	11
3.2.1 Papel do sistema límbico na memória	15
3.2.2 Farmacologia da fase inicial da memória	20
3.2.3 A Bioquímica da formação da memória e sua regulação por hormônios e neuromoduladores	20
<b>4. EXCITOTOXICIDADE</b>	<b>25</b>
4.1 Papel do Cálcio	25

4.2	Papel do glutamato na isquemia cerebral	26
4.3	Óxido nítrico	28
<b>5.</b>	<b>PAPEL DAS CÉLULAS NÃO NEURONAIS DURANTE O DANO CEREBRAL</b>	<b>30</b>
5.1	Astrócitos	30
5.2	Microglia e macrófago perivasculares	30
5.3	Células endoteliais	31
<b>6.</b>	<b>ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS CONTRA A EXCITOTOXICIDADE</b>	<b>32</b>
<b>7.</b>	<b>METILXANTINAS</b>	<b>34</b>
7.1	Ações das metilxantinas	36
7.1.1	Antagonismo de receptor da adenosina	36
7.1.2	Inibição da fosfodiesterase	36
7.1.3	Cálcio	37
7.1.4	Outras interações farmacológicas das metilxantinas	38
7.1.4.1	Receptores benzodiazepínicos/receptores subtipo GABA <sub>A</sub>	38
7.1.4.2	Interação com a adrenalina	39
7.1.4.3	Metabólitos do ácido aracdônico	39
<b>8.</b>	<b>PENTOXIFILINA (Trental®)</b>	<b>40</b>
8.1	Descrição	40
8.2	Modo de ação	40
8.3	Efeitos hemorreológicos da pentoxifilina	41
8.4	Efeitos cardiovasculares	44
8.5	Efeitos da pentoxifilina no SNC	44
8.6	Efeitos gerais	45
8.7	Farmacocinética	47
8.8	Indicações e usos	49

8.9	Contra-indicações	50
8.10	Interações com outras drogas	51
8.11	Carcinogênese, mutagênese e interferência na fertilidade	51
8.12	Reações adversas	52
<b>9.</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA</b>	<b>53</b>
<b>II –</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>54</b>
	Geral	55
	Específicos	55
<b>III -</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
1.	Animais	58
2.	Cirurgia estereotáxica	58
3.	Drogas usadas nos tratamentos	61
4.	Protocolo experimental	62
5.	Estudo histopatológico	63
5.1	Método de coloração pela Hematoxilina-eosina	64
6.	Testes Comportamentais	65
6.1	Testes de atividade locomotora	65
6.2	Testes de memória	65
6.2.1	Esquiva passiva ( passive avoidanc test)	65
6.2.2	Labirinto em T (T maze)	67
6.2.3	Labirinto aquático (Morris water maze)	68
7	Determinação da densidade dos receptores muscarínicos	70
8	Determinação dos níveis de AMPc	72
9	Dosagem de nitrito/nitrato	75
10	Avaliação da peroxidação lipídica (Dosagem de Malonildialdeido-MDA)	76
11	Avaliação do efeito da pentoxifilina nos tremores induzidos pela oxotremorina	77
12	Determinação da atividade da acetilcolinestarase (AChE)	77

13	Análise estatística	79
<b>IV</b>	<b>– RESULTADOS</b>	<b>81</b>
1.	Análise histológica dos efeitos do glutamato no hipocampo de rato	82
2.	Efeito do glutamato na atividade locomotora (teste de campo aberto)	85
3.	Efeito do glutamato no teste da esquiva passiva	85
4.	Efeito da lesão hipocampal com glutamato no teste do labirinto em T elevado em ratos.	89
5.	Efeito da lesão hipocampal com glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos.	91
6.	Efeito citoprotetor da pentoxifilina em hipocampo de ratos lesados com glutamato	92
7.	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato, no teste do campo aberto.	98
8.	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do labirinto em T elevado.	98
9.	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da esquiva passiva.	101
10.	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato no teste do labirinto aquático de Morris	103
11.	Ação do glutamato e pentoxifilina sobre os níveis de AMPc no hipocampo de ratos.	105
12.	Ação do glutamato e pentoxifilina sobre o número de receptores muscarínicos (M1 + M2) no homogenato de hipocampo de ratos.	110
13.	A pentoxifilina potencia os tremores induzidos pela oxotremorina em camundogos.	113
14.	Efeito do glutamato e da pentoxifilina sobre a formação de malonildialdeído em homogenato de hipocampo de rato.	113
15.	Efeito do glutamato e pentoxifilina sobre a produção de Nitrito/Nitrato em homogenato de hipocampo de ratos.	116
16.	A ciclopentiladenosina (CPA) inibe os efeitos da pentoxifilina em ratos com	116

lesão hipocampal por glutamato, no teste do campo aberto.	
17. A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato, no teste do labirinto em T elevado.	119
18. A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato, no teste da esquiva passiva.	121
19. A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do labirinto aquático de Morris.	121
20. A talidomida não potencia os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do campo aberto.	123
21. A talidomida reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do labirinto em T elevado.	123
22. A talidomida não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da esquiva passiva.	126
23. A talidomida não potencia os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do labirinto aquático de Morris.	126
24 . Inibição da atividade da acetilcolinesterase pela pentoxifilina in vitro	129
<b>V – DISCUSSÃO</b>	<b>132</b>
<b>VI – CONCLUSÃO</b>	<b>162</b>
<b>VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>165</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AAE</b>	Aminoácidos excitatórios
<b>AMI</b>	Amígdala
<b>AMPA</b>	Propionato de $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole
<b>AMPc</b>	3',5'-monofosfato de adenosina cíclico
<b>AP5</b>	(D-)2-amino-5-fosfopentanoato
<b>AP7</b>	(D-)2-amino-7-fosfonoheptanoato
<b><math>\beta</math>-APP</b>	Proteína precursora $\beta$ -amilóide
<b>APV</b>	D-2-amino-5-fosfonovalerato
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>c.p.m</b>	Cintilações por minuto
<b>CE</b>	Córtex entorrinal
<b>CGS-19755</b>	(+)cis-4-fosfonometil-2-piperidinacarboxilato
<b>CO</b>	Monóxido de oxigênio
<b>CPA</b>	Ciclopentiladenosina
<b>CPPene</b>	(R,S)-4-fosfonoprop-2-enil)piperazina-2-carboxilato
<b>CREB</b>	c-AMP-responsive element binding protein
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>eNOS</b>	Óxido nítrico sintase isoforma endotelial
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>GABA</b>	Ácido gama aminobutírico
<b>GFAP</b>	Glial fibrillary acidic protein
<b>h</b>	Hora
<b>HIP</b>	Hipocampo

<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alto desempenho
<b>IBMX</b>	Isobutilmetilxantina
<b>i.h.</b>	Intrahipocampal
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IP<sub>3</sub></b>	Inositoltrifosfato
<b>L-AP4</b>	2-amino-4-fosfobutirato
<b>LTP</b>	Long-term potentiation
<b>M</b>	Molar
<b>MDA</b>	Malonil dialdeído ou malondialdeído
<b>μg</b>	Micrograma
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>min</b>	Minutos
<b>MK-801</b>	5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo-(a,d)-ciclohepten-5,10-imine
<b>mNOS</b>	Óxido nítrico sintetase isoforma presente nos macrófagos
<b>n</b>	Número
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatase
<b>nm</b>	Nanômetro
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartato
<b>nNOS</b>	Óxido nítrico sintetase isoforma neuronal
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>PAF</b>	Fator de ativação plaquetária

<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado das plaquetas
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>ptx</b>	Pentoxifilina
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>s</b>	Segundos
<b>SIDA</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>SM</b>	Septo medial
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TNF-<math>\alpha</math>-</b>	Fator de necrose tumoral
<b>Trans-ACPD</b>	Ác. 1-aminociclopentano-trans-1,3-dicarboxílico



## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Receptores do Glutamato	6
2	Receptores metabotrópicos	8
3	Modelo de indução de Long Term Potentiation (LTP)	16
4	Circuito hipocampal e neurotransmissores envolvido na LTP	17
5	Sistema límbico e suas vias aferentes e eferentes	19
6	Estrutura química das metilxantinas	35
7	Estrutura química da Pentoxifilina	40
8	Ação da pentoxifilina na síntese de prostaciclina e tromboxano	43
9	Farmacocinética da Pentoxifilina	48
10	Aparelho estereotáxico	59
11	Animal posicionado no aparelho estereotáxico	59
12	Área hipocampal a ser lesada	60
13	Arena do Campo Aberto	66
14	Aparelho de Esquiva Passiva	66
15	Labirinto em T elevado	69
16	Labirinto de aquático de Morris	69
17	Alterações histopatológicas produzidas pelo glutamato em hipocampo de rato	83
18	Efeito do glutamato na atividade locomotora (teste do campo aberto) de ratos	86
19	Efeito do glutamato no teste da Esquiva Passiva em ratos.	87
20	Efeito do glutamato no teste do labirinto em T elevado em ratos	90
21	Efeito do glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos- Aprendizagem	93
22	Efeito do glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos – Retenção da memória	94

23	Efeito do glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos- Número de travessias	95
24	Efeito citoprotetor da pentoxifilina em hipocampo de ratos lesados com glutamato.	96
25	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato, no teste do campo aberto.	99
26	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do labirinto em T elevado.	102
27	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da esquiva passiva.	104
28	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato no teste do labirinto aquático de Morris- Aprendizagem	106
29	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato no teste do labirinto aquático de Morris- Retenção	107
30	Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato no teste do labirinto aquático de Morris- N <sup>o</sup> de quadrantes atravessados	108
31	Ação da pentoxifilina sobre o número de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenato de hipocampo de rato	112
32	A pentoxifilina potencia os tremores induzidos pela oxotremorina em camundongos.	114
33	Ciclopentiladenosina (CPA) reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do campo aberto.	118
34	A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do labirinto em T elevado.	120
35	Ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por	122

	glutamato, no teste da esquiwa passiva.	
<b>36</b>	A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto Aquático de Morris-Retenção	<b>124</b>
<b>37</b>	A talidomida não potencia os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do campo aberto.	<b>125</b>
<b>38</b>	A talidomida reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto em T elevado.	<b>127</b>
<b>39</b>	A talidomida reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da esquiwa passiva.	<b>128</b>
<b>40</b>	A talidomida não potencia os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto Aquático de Morris-Retenção.	<b>130</b>
<b>41</b>	Inibição da atividade da acetilcolinestarese (AChE) pela pentoxifilina	<b>131</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELAS</b>		<b>PÁGINA</b>
<b>1</b>	Agonistas e Antagonistas do receptor do Glutamato	<b>6</b>
<b>2</b>	Alterações histopatológicas induzidas pelo glutamato no hipocampo de rato	<b>84</b>
<b>3</b>	Efeito citoprotetor da pentoxifilina em hipocampo de ratos lesionados com glutamato	<b>97</b>
<b>4</b>	Concentração de AMPc em homogenato de hipocampo de ratos lesados com glutamato e tratados com pentoxifilina.	<b>109</b>
<b>5</b>	Efeito do glutamato e pentoxifilina sobre o n° de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenato de hipocampo de ratos.	<b>111</b>
<b>6</b>	Efeito do glutamato e pentoxifilina sobre a formação de malonildialdeído em homogenato de hipocampo de rato	<b>115</b>
<b>7</b>	Efeito do glutamato e pentoxifilina sobre a produção de nitrito/nitrato em homogenato de hipocampo de ratos.	<b>117</b>

## RESUMO

**ESTUDO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO DA PENTOXIFILINA SOBRE A LESÃO HIPOCAMPAL E DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR GLUTAMATO EM RATOS.** Geanne Matos de Andrade Cunha. Tese de Doutorado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, 1999.

O presente trabalho mostra os efeitos da pentoxifilina (ptx), no aprendizado e na memória de ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato (glu). Os animais (ratos Wistar, machos, 200-250g), foram submetidos à cirurgia estereotáxica e injetados com glutamato nas doses de 24, 48, 96 e 192 µg, na região hipocampal (áreas CA1 e CA3). Após 7 dias, os animais foram submetidos ao teste do campo aberto e aos teste de memória (esquiva passiva, labirinto em T elevado e labirinto aquático de Morris). Após vinte e quatro horas, os animais foram sacrificados para a avaliação histológica da lesão. Não foram observadas lesões significativas nos animais tratados com salina e glu (24 e 48 µg), já os animais que receberam as doses de 96 e 192 µg, apresentaram lesões avaliadas como moderada e grave, respectivamente. Os animais tratados com a dose de 192 µg apresentaram um aumento da atividade locomotora (salina:  $14,82 \pm 2,59$ , glu192-  $31,10 \pm 6,50$  quadrantes). No teste de esquiva passiva, os grupos tratados com glu 48, 96 e 192 µg demonstraram um déficit de memória, tanto na memória recente (salina:  $200,43 \pm 52,09$ ; glu24:  $210,20 \pm 44,77$ ; glu48:  $27,61 \pm 9,89$ ; glu96:  $64,46 \pm 31,93$ ; glu192:  $140,29 \pm 40,76$ s), quanto na memória tardia (salina:  $252,57 \pm 31,78$ ; glu24:  $273,70 \pm 22,27$ ; glu48:  $44,35 \pm 32,21$ ; glu96:  $29,39 \pm 14,54$ ; glu192:  $140,29 \pm 40,76$ s). No teste do labirinto em T elevado, os animais tratados com glu nas maiores doses, demonstraram um aprendizado menos eficiente do que aqueles do grupo tratado com salina. A análise da retenção da memória no teste do labirinto aquático, mostrou um dano na memória espacial nos animais tratados com glu (salina:  $10,95 \pm 3,56$ , glu96:  $26,89 \pm 3,97$ , glu192:  $32,79 \pm 4,78$ s). A ptx na dose de 100mg/kg protegeu os animais da lesão induzida pelo glu (96 µg) com 75% dos animais apresentando somente lesões leves. A ptx não alterou a atividade locomotora, mas quando usada nos animais lesados, foi observado um aumento da atividade (ptx100 + glu:  $24,81 \pm 4,00$  quadrantes). No teste do labirinto em T elevado, o aprendizado nos animais tratados com ptx (100 e 200mg/kg) foi bastante eficiente, superando inclusive o aprendizado do controle e diminuindo déficits ocasionados pelo glu, (Esquiva 3- salina:  $188,51 \pm 26,66$ , glu96:  $144,76 \pm 33,74$ , ptx100:  $293,55 \pm 6,44$ , ptx200:  $185,25 \pm 32,45$  ptx100+glu:  $237,42 \pm 29,06$ , ptx200+glu:  $168,32 \pm 41,07$ s) (Kruskal-Wallis-KM,  $p < 0,05$ ). No teste da esquiva passiva a ptx reduziu os efeitos amnésicos produzidos pela lesão com glu (memória tardia- ptx50+glu:  $300,00 \pm 0,00$ , ptx100+glu:  $176,67 \pm 34,32$ ; ptx200+glu:  $221,19 \pm 35,41$ s (KW,  $p < 0,05$ ). No teste do labirinto aquático, a ptx 200mg/kg, também foi efetiva, no que se refere à retenção do aprendizado, (ptx200+glu:  $12,96 \pm 1,84$ s). A lesão com glu, ocasionou uma diminuição nos níveis de AMPc, o que foi revertido pela ptx (salina: 0,966, glu: 0,186, ptx100+glu: 1,060pmol/mg de proteína. O tratamento prévio com CPA, um agonista da adenosina (A1), não reverteu os efeitos da ptx na memória e este efeito não foi potenciado pela talidomida. Foi observado um efeito colinérgico central da ptx, demonstrado pelo aumento do número de tremores induzido pela oxotremorina (oxo:  $1,53 \pm 0,33$ , ptx50 + oxo:  $5,30 \pm 1,23$ , ptx100+oxo:  $8,47 \pm 0,61$  escores/30min), pela diminuição do número de receptores M1+M2, (salina: 181,71, ptx100:  $132,74 \pm 11,80$  fmoles/mg de

proteína) e pela diminuição da atividade da AChE . Também foi demonstrado um aumento nos níveis de nitrito/nitrato pelo glu e uma diminuição pelo tratamento com ptx (salina:  $5,24 \pm 0,82$ , glu96:  $9,22 \pm 1,20$ , ptx100+glu:  $5,98 \pm 0,46 \mu\text{M}$ ). É possível que o efeito citoprotetor da ptx possa estar relacionado à ação antiinflamatória da droga, através da inibição da produção de citocinas, tais como  $\text{TNF}\alpha$  e da inibição de liberação de espécies reativas de oxigênio pela células da glia. Além disso, o aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos e a ação colinérgica central demonstrada com a ptx poderão também ter contribuído para a redução dos déficits de memória induzidos pela lesão hipocampal por glutamato em ratos.

## ABSTRACT

### STUDY OF THE MECHANISMS INVOLVED IN THE PENTOXIFYLLINE ACTION ON GLUTAMATE-INDUCED HIPPOCAMPAL LESIONS AND MEMORY DEFICITS IN RATS.

The present work shows effects of pentoxifylline (ptx) on learning and memory in rats with hippocampal lesion induced by glutamate (glu). The animals (male Wistar rats, 200-250g) were submitted to stereotaxic surgery and injected in the hippocampus (CA1, CA3) with glu at doses of 24, 48, 96 and 192  $\mu\text{g}$ . After 7 days, animals were tested in the open-field to evaluate locomotor activity and submitted to memory tests (passive avoidance, elevated T maze, and water maze). Twenty-four hours later, animals were sacrificed for histopathological studies. The results show no significant lesion in the saline and glu (24 and 48  $\mu\text{g}$ ) groups. However, moderate to severe lesions were observed at higher glu doses (96 and 192  $\mu\text{g}$ ). Increased locomotor activity after glu as compared to controls was observed only with the dose of 192  $\mu\text{g}$  (saline:  $14,82 \pm 2,59$ , glu192:  $31,10 \pm 6,50$  squares). In the passive avoidance test the groups treated with glu 48, 96 and 192  $\mu\text{g}$ , showed memory deficits, in early memory (saline:  $200,43 \pm 52,09$ ; glu24:  $210,20 \pm 44,77$ ; glu48:  $27,61 \pm 9,89$ ; glu96:  $64,46 \pm 31,93$ ; glu192:  $140,29 \pm 40,76$ s), as well as in the late memory (saline:  $252,57 \pm 31,78$ ; glu24:  $273,70 \pm 22,27$ ; glu48:  $44,35 \pm 32,21$ ; glu96:  $29,39 \pm 14,54$ ; glu192:  $140,29 \pm 40,76$ s). In the elevated T-maze, animals treated with glu at higher doses showed a lower performance as compared to controls. Analyses of memory retention in the water maze showed deficit in spatial memory (saline:  $10,95 \pm 3,56$ , glu96:  $26,89 \pm 3,97$ , glu192:  $32,79 \pm 4,78$ s). Ptx at 100mg/kg, protected animals against glu(96  $\mu\text{g}$ )-induced lesion. Besides ptx did not alter locomotion activity, but when injected in lesioned animals an increased locomotor activity was observed. In the elevated T-maze, ptx-treated animals presented a better performance, decreased the deficits produced by glu (Avoidance 3- saline:  $188,51 \pm 26,66$ , glu96:  $144,76 \pm 33,74$ , ptx100:  $293,55 \pm 6,44$ , ptx200:  $185,25 \pm 32,45$ , ptx100+glu:  $237,42 \pm 29,06$ , ptx200+glu:  $168,32 \pm 41,07$ s) (KW,  $p < 0,05$ ). In the passive avoidance test, ptx reduced the amnesic effects produced by glu lesion (late memory- ptx50+glu:  $300,00 \pm 0,00$ , ptx100+glu:  $176,67 \pm 34,32$ ; ptx200+glu:  $221,19 \pm 35,41$ s) (KW,  $p < 0,05$ ). In the water maze test, ptx was also effective as far as learning acquisition is concerned (ptx200+glu:  $12,96 \pm 1,84$ s). The glu lesion caused a decrease in cAMP levels which was reverted by ptx (saline:  $0,966$ , glu:  $0,186$ , ptx100+glu:  $1,060$  pmol/mg protein). Pre-treatment with CPA, A1, adenosine agonist or with thalidomide (TNF- $\alpha$  inhibitor) did not reversed or potentiated respectively ptx effects on rat memory. A central cholinergic (muscarinic) effect of ptx, was also demonstrated by the potentiation of oxotremorine (muscarinic agonist) induced tremors by ptx (oxo:  $1,53 \pm 0,33$ , ptx50 + oxo:  $5,30 \pm 1,23$ , ptx100+oxo:  $8,47 \pm 0,61$  scores/30min). Besides, ptx decreased muscarinic receptor number (saline:  $181,71$ , ptx100:  $132,74 \pm 11,80$  fmoles/mg protein) on brain hippocampus and decreased AChE activity. An increase and decrease respectively nitrite/nitrate levels were detected after glu and ptx+glu groups (saline:  $5,24 \pm 0,82$ , glu96:  $9,22 \pm 1,20$ , ptx100+glu:  $5,98 \pm 0,46$   $\mu\text{M}$ ). It is possible that, the citoprotector effect demonstrated by ptx in the present work is related to the antiinflammatory effect of the drug, through the inhibition of the cytokines production such as TNF- $\alpha$  and the inhibition of reactive oxygen species produced by ptx. Besides, the increased in cAMP levels produced by ptx associated to its central cholinergic action could contribute to the reduction of memory deficits detected after glutamate induced hippocampal lesion in rats.

## *I - INTRODUÇÃO*

---



# I- INTRODUÇÃO

---

## 1. GLUTAMATO

Glutamato e aspartato são os mais abundantes neurotransmissores excitatórios no cérebro (Watkins & Olverman, 1987). Devido as suas altas concentrações e larga distribuição estes aminoácidos influenciam todas as funções do sistema nervoso central. Por exemplo, podem contribuir para anormalidades associadas com a epilepsia, danos cerebrais característicos das desordens neurodegenerativas tais como, doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, além das alterações associadas a isquemia cerebral, traumatismo cerebral e encefalopatia devido a SIDA (Hayes *et al.*, 1992; Lancaster, 1992; Spink & Martin, 1991; Lipton *et al.*, 1991; Dingleline *et al.*, 1990; Choi *et al.*, 1990; Meldrum & Garthwaite, 1990; Faden *et al.*, 1989). Entretanto estes neurotransmissores desempenham um papel importante no aprendizado e memória (Bliss & Collingridge, 1993; Willner *et al.*, 1992; Ng *et al.*, 1991; Davis *et al.*, 1992)

As tentativas de descobrir drogas que agem modificando a neurotransmissão induzida pelos amino ácidos excitatórios (AAE) têm sido dificultadas pelos potenciais efeitos colaterais destes agentes, assim a inibição generalizada da neurotransmissão está associada a prejuízos no aprendizado e memória, diminuição no tônus muscular e sedação, enquanto a estimulação diminui o limiar convulsivo e pode causar danos neuronais irreversíveis. Estes efeitos globais refletem o fato de que os AAE são encontrados em todas as partes do cérebro, sendo importante vislumbrar caminhos para modificar a ação dos AAE de uma maneira seletiva. Nos últimos anos foram descobertos vários subtipos de receptores para o glutamato,

fazendo-se possível o desenvolvimento de drogas capazes de estimular ou inibir a função destes receptores seletivamente.

## 1.1 CLASSIFICAÇÃO DOS RECEPTORES DO GLUTAMATO

A classificação inicial dos receptores dos AAE foi baseada na sua ativação seletiva pelo NMDA (N-metil-D-aspartato) e cainato (acetato de 2-carboxi-4-isopropenil-3-pirrolidina), análogos estruturais do glutamato (Haldeman & McLennan, 1972; Haldeman *et al.*, 1972; Duggan, 1974; Johnston *et al.*, 1974; McCulloch *et al.*, 1974). Depois um terceiro tipo foi proposto, mais responsivo ao AMPA (propionato de  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazole) e menos seletivo ao quisqualato ( $\beta$ -(3,5-dioxo-1,2,4-oxadiazolidin-2-il)-L-alanina) (Watkins & Evans, 1981; McLennan, 1983; Lerma *et al.*, 1989; Mayer & Vyklicky, 1989; Zorumski *et al.*, 1990). Um quarto tipo de receptor é estimulado pelo *trans*-ACPD (*trans*-1-amino-ciclopentil-1,3-dicarboxilato) e um quinto foi identificado com base na sua resposta seletiva ao L-AP4 (2-amino-4-fosfobutirato) (Manzoni *et al.*, 1990; Schoepp & Johnson, 1988; Cha *et al.*, 1990; Koerner & Cotman, 1981; Lanthorn *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1983).

Os receptores dos AAE também podem ser classificados com base em seus sistemas efetores, enquanto NMDA, cainato e AMPA são acoplados a canais iônicos cátions-específicos (ionotrópicos) (Zorumski & Thio, 1992; Monaghan *et al.*, 1988), *trans*-ACPD e L-AP4 são ligados a proteínas G, que agem via hidrólise de fosfoinositídeos (metabotrópicos) (Schoepp *et al.*, 1991; Trombley & Westbrook, 1992).

## 1.2. RECEPTORES IONOTRÓPICOS

### 1.2.1 Receptor NMDA

Existem pelo menos dois tipos de receptores NMDA, o melhor caracterizado consiste de complexos heteroméricos com várias subunidades (NR1, NR2A, NR2B, NR2C e NR2D) (Monyer *et al.*, 1992), e aparentemente no sistema nervoso central, ocorrem combinações de NR1 com uma das subunidades de NR2. O segundo tipo foi menos estudado e consiste de um complexo de proteínas, com uma subunidade de ligação de 71 kD (NMDARP-71), que exibem condutância e propriedades farmacológicas idênticas ao primeiro tipo (Kumar *et al.*, 1991).

Os receptores NMDA possuem vários sítios regulatórios. Os sítios de reconhecimento são bloqueados competitivamente por várias drogas entre elas, AP5 ((D-)2-amino-5-fosfopentanoato) e seu homólogo AP7 ((D-)2-amino-7-fosfonoheptanoato) (Davies *et al.*, 1981; Evans *et al.*, 1982), CPPene (R,S)-4-(fosfonoprop-2-enil)piperazina-2-carboxilato) (Lehmann *et al.*, 1987), CGS-19755 ((+)cis-4-fosfometil-2-piperidinacarboxilato) (Lehmann *et al.*, 1988). Os receptores NMDA também são inibidos não competitivamente por compostos que se ligam a sítios específicos dentro do canal iônico, dentre eles PCP (1-(1-fenilciclohexil) piperidina ou fenilciclidina), quetamina (Anis *et al.*, 1983) e MK-801 (5-metil-10,11-diidro-5H-dibenzo-(a,d)-ciclohepten-5,10-imine) (Wong *et al.*, 1986).

Johnson e Archer (1987) descobriram que a glicina aumenta as ações dos agonistas de NMDA mas não tem ação por si só. Em concentrações tão baixas quanto 0,1  $\mu$ M ela aumenta as respostas do receptor NMDA de uma maneira que não é bloqueada pela estriçnina. Estudos de *patch clamp* demonstram que a glicina

aumenta a frequência de abertura do canal acoplado ao receptor NMDA e não a amplitude da corrente e esta ação não depende de segundo mensageiro (Kleckner & Dingledine, 1988).

Outro componente regulatório no receptor NMDA é o sítio de ligação de poliaminas, tais como, espermina e espermidina, que aumentam a afinidade de ligação do MK-801 no canal do receptor NMDA (Ramsom & Stec, 1988; Javitt & Zukin, 1989). Os efeitos neste sítio são antagonizados por compostos tais como, ifenprodil e seu análogo SL-820715 (Reynolds, 1990; Carter *et al.*, 1990). Alguns íons como o  $Mg^{+2}$  e  $Zn^{+2}$  bloqueiam o receptor NMDA, o primeiro de maneira voltagem dependente e o segundo independente, agindo em sítios diferentes (Meyer *et al.*, 1984; Westbrook & Mayer, 1987).

A ativação do receptor NMDA provoca a abertura do canal iônico com a entrada de íons  $Ca^{+2}$ , em algumas células isto leva a ativação de uma proteína chamada calmodulina, que por outro lado estimula a produção de óxido nítrico e este ativando a guanilato ciclase pode destruir neurônios diretamente (Izumi *et al.*, 1992; Dawson *et al.*, 1991). A inibição da óxido nítrico sintetase protege contra o dano neuronal induzido pelo NMDA, isquemia e hipóxia (Moncada *et al.*, 1992; Wallis *et al.*, 1992).

### 1.2.2 Receptor Cainato e AMPA

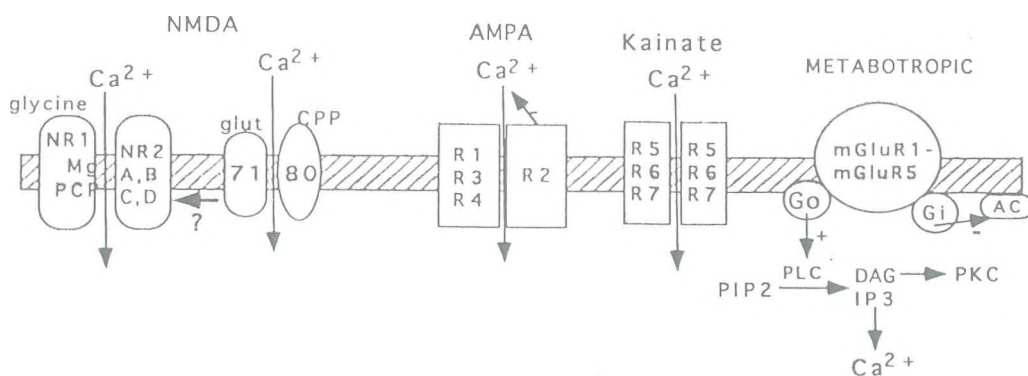
A família do receptor AMPA consiste de subunidades designadas GluR1-GluR4 (Keinanen *et al.*, 1990). A subunidade GluR2 confere ao receptor AMPA impermeabilidade ao cálcio, enquanto a perda desta subunidade o torna permeável a este cátion (Hollman *et al.*, 1991). O receptor é encontrado nos neurônios e glia em todo o cérebro (Egebjerg *et al.*, 1991). Os receptores cainato consistem de subunidades designadas Glu5-Glu7 (Brorson *et al.*, 1994). Estudos em cultura de

células cerebelares mostram que o influxo de cálcio através dos receptores AMPA/kainato desempenham um importante papel na excitotoxicidade (Anis *et al.*, 1983). Os receptores AMPA/cainato abrem canais de cátions, com a entrada de sódio e despolarização da membrana neuronal e isto elimina o bloqueio de canal iônico acoplado ao receptor NMDA pelo magnésio, propiciando a entrada de cálcio por este receptor (Figura 1).

### 1.2.3 Receptores Metabotrópicos

Estes receptores são acoplados a proteínas ligantes de GTP (proteínas G), que atuam na fosfolipase C ou adenililciclase (Schoepp & Conn, 1993). Já foram clonados 5 subunidades deste receptor e foram designados mGluR1 a mGluR5. A ativação da fosfolipase C pelo mGluR1 e mGluR5 induz a hidrólise de difosfato de fosfatidilinositol para produzir diacilglicerol (DAG) e inositoltrifosfato (IP<sub>3</sub>) (Nicoletti *et al.*, 1986). As subunidades mGluR2, mGluR3 e mGluR4 ativam uma proteína G inibitória que inibe a atividade da adenililciclase com diminuição do AMP<sub>c</sub> (Figura 2).

O RNAm que codifica estes receptores está expresso em altos níveis no hipocampo, na região do giro denteado e CA1-CA3, no córtex e no cerebelo (Ohishi *et al.*, 1993). Embora a ativação dos receptores metabotrópicos não induza diretamente neurotoxicidade, sua estimulação pode aumentar a excitabilidade neuronal e um aumento nos níveis da Ca<sup>+2</sup> intracelular. A figura 1 mostra um desenho esquemático da estrutura dos receptores do glutamato com os sítios de ligação e ações e a tabela 1 os principais agonistas e antagonistas dos receptores do glutamato com os ligantes mais usados para seu estudo.



**Figura 1- Receptores do Glutamato.** Estrutura aparente dos receptores do glutamato (NMDA, AMPA, kainato e metabotrópico). Os receptores NMDA são divididos em duas categorias maiores, uma consiste de estruturalmente das subunidades NR1, NR2A, NR2B, NR2C, NR2D, a segunda classe consiste das subunidades de 71kD e 80kD. Os receptores AMPA consiste das subunidades GluR1-R4 e os receptores AMPA, das subunidades GluR5-R7. Os receptores metabotrópicos (mGluR1-R5) consistem de proteínas acopladas ao GPT, que catalizam a hidrólise de fosfoinositídeos com formação de IP3 e DAG e também à inibição da adenililciclase, com diminuição de AMPc. Segundo Seeburg, 1993.

**Tabela 1- Agonistas e Antagonistas do receptor do Glutamato**

	NMDA		AMPA		Kainato	Metabotrópico
	Competitivo	Modulatório	Competitivo	Modulatório		
Agonista	NMDA L-CCG-IV ACBI	Glicina	AMPA ATPA 5-Fluorovilardina Br-HIBO	Aniracetam 1-BCP Ciclotiazida	Cainato Domoato	trans-ACPD L-CCG-I L-AP4 3,5-dihidroxi- fenilglicina trans-2,4-ADA
Antagonista	D-AP5 CGS19755 CGP37849 D-CPP D-CPPene	7-Cloro- kenurenato 5,7-dicloro- kenurenato MNOX 1.689.560 HA966	NBQX	GYKI 52466		L-AP3 (+)-MCPG (S)-4CPG
Bloqueador de canal	MK801 PCP					

Abreviaturas- L-CCG-IV- (2S,3R,4S)- $\alpha$ (carboxiciclopropil)glicina; D-AP5- ác. D-2-amino-5-fosfonopentanóico; ACBI- 1-aminociclobutano-1,3-dicarboxilato; CGS19755- ác. *cis*-4-(fosfonometil)piperidina-2-carboxílico; CGP37849- ác. D,L-(1E)- 2-amino-4-metil-5-fosfonopentonóico; CPP- ác. 3-(2-carboxipiperazin-4-il)propil-1-fosfonico; CPPene- ác.(E)-4-(3-fosfono-2-propenil)piperazina-2-carboxílico; MK-801-, dizocilpina; PCP- fenciclidina; MNQX- 5,7-dinitroquinoxaline- 2,3-dione; L689.560- ( $\pm$ )-4-*trans*-2-carboxi-5,7-dicloro-4-fenilaminovarbo-nilamino-1,2,3,4-tetrahydroquinolina; ATPA-  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-terbutil-4-isoxazole-propionato; HA966- 3-amino-1-hidroxipirrolidin-2-one; Br-HIBO- (s)-4-bromohomoibotenato; NBQX- 2,3-dihidro-6-nitro-7-sulfamoil-benzo(F)-quinoxalina;aniracetam- 1-94-metoxibenzoil)-2-pirrolidina; 1-BCP- 1-(1,3-benzodioxol-5-ilcarbonil)-piperidina; GYKI 52466- 1-(4-aminofenil)-4-metil-7,8-metilenodioxo-5H-2,3-benzodiazepina; *trans*-ACPD- ác. 1-aminociclopentano-*trans*-1,3-dicarboxílico; L-CCG- 1,(2S,3S,4S)-  $\alpha$ (carboxiciclopropil)glicina; L-AP4- ác. 1-2-amino-4-fosfonobutírico; *trans*-2,4-ADA- ác. *trans*-azetidina-2,4-dicarboxílico; L-AP3- ác. 1-2-amino-3-fosfonopropionico; (+)-MCPG- (+)- $\alpha$ -metil-4-carboxifenilglicina; (S)-4CPG- (S)-4-carboxifenilglicina.

Os receptores metabotrópicos podem ser divididos em 3 subgrupos. Os agonistas mais seletivos usados na caracterização destes subgrupos foram quisqualato, 2-CCG, trans-ACPD e L-AP4. Evidências indicam que a ativação dos receptores metabotrópicos podem ter efeitos neuroprotetores e neurotóxicos. Koh e cols. (1991), demonstraram que trans-ACPD pode atenuar a excitotoxicidade induzida pelo NMDA em culturas de células corticais, embora outros estudos indicam efeitos neuroprotetores de agonistas de receptores metabotrópicos (Sacaan & Schorepp, 1992). O receptor L-AP4 foi definido eletrofisiologicamente como um sítio inibitório do glutamato, este receptor está localizado pré-sinápticamente e sua ativação inibe a liberação de glutamato (Anson & Collins, 1987) (Figura 2, Tabela 1).

## 2. SÍNTESE E TRANSPORTE DE GLUTAMATO

Glicose e glutamina parecem ser os precursores para a biosíntese de glutamato no cérebro (Bradford & Thomas, 1969; Shank & Aprison, 1977). A glicose está disponível na corrente sanguínea em grandes quantidades e como a taxa de degradação está aumentada na estimulação nervosa, ela é algumas vezes considerada como um importante precursor para a síntese de glutamato (Davidson, 1976), via ciclo do ácido cítrico e desidrogenase glutâmica. A glutamina está presente no fluido cerebrospinal e assim, extracelularmente, no cérebro em concentrações em torno de 0,4 mM (Plum, 1974). Além disso, os nervos terminais têm quantidades significativas de glutaminase, enzima que catalisa a síntese do glutamato nos nervos terminais (Bradford & Ward, 1976). Trabalhos demonstram que a síntese e efluxo de glutamato na presença de concentrações fisiológicas de glutamina é 3 a 6 vezes maior, do que na presença de glicose sozinha (Anders *et al.*, 1979).

receptor	group	effector	agonist	antagonist
mGlu1a	I	PLC	(S)-DHPG	AIDA, CPCCOEt
mGlu5a				
mGlu2				
mGlu3	II	AC	DHPG, t-CA, t-PCG, LY354740	MCCG, LY341495, FCCG-IV
DmGluA				
mGlu4				
mGlu8	III	AC	t-AP5	MAPLAPDC
mGlu7				
mGlu6	?	PLD	t-AP5, t-CSA	FCCG-1b
PLD-coupled mGlu receptor				

*n.s.* - MLN, and t-6-RLPG are widely used broad-spectrum mGlu ligands.  
 \*Group I mGlu receptors stimulate PLC. It has been reported to be potently toxin-resistant in some cells.  
 †Also has agonist activity in rat cortical slices.

- Key**
- Group I mGlu receptor
  - Group II mGlu receptor
  - Group III mGlu receptor
  - hypothesized PLD-coupled mGlu receptor
  - arachidonic acid
  - adenyl cyclase
  - heterotrimeric G protein
  - phospholipase A2
  - phospholipase C
  - phospholipase D
  - protein kinase C
  - excitatory
  - inhibitory

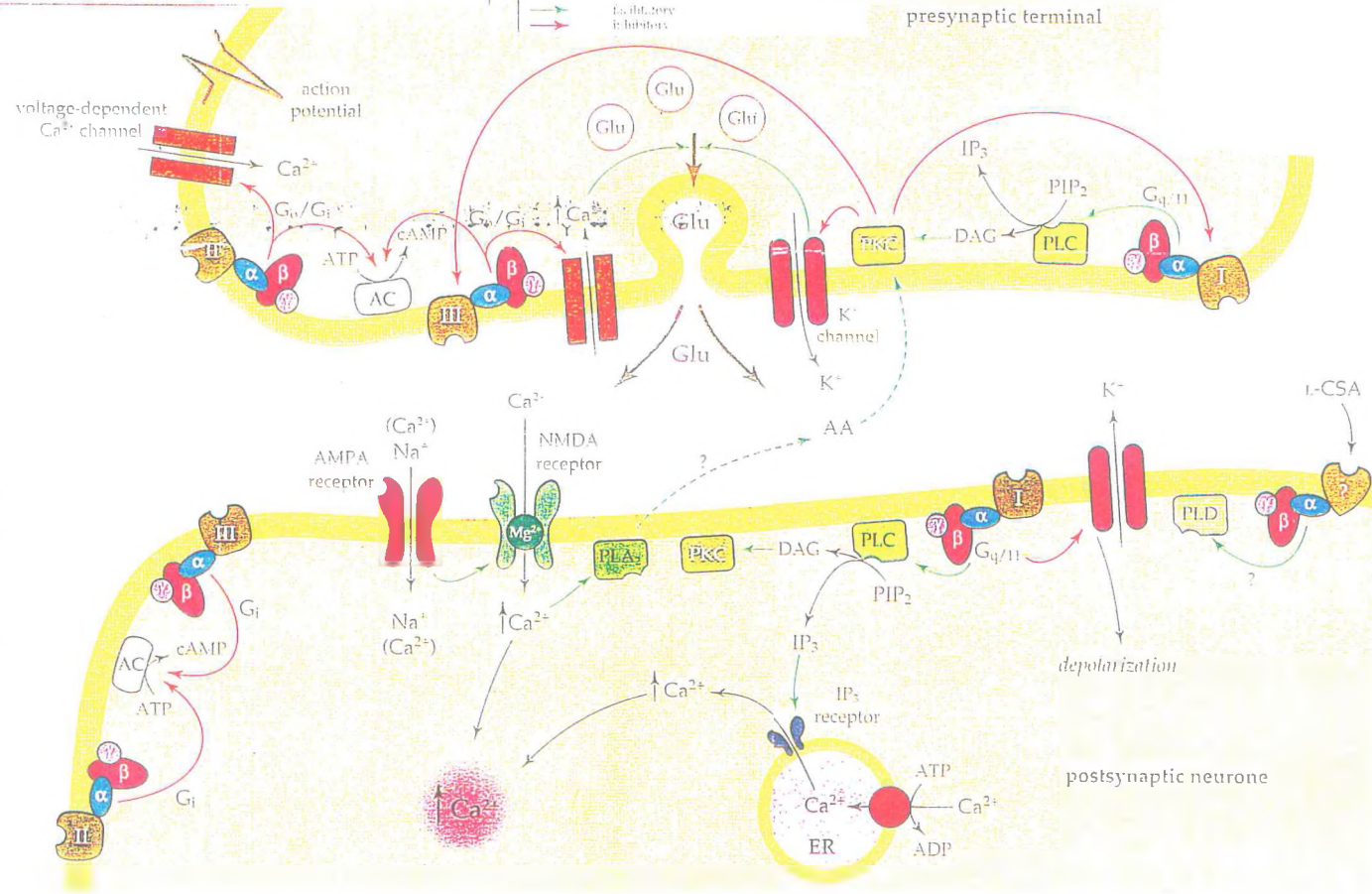
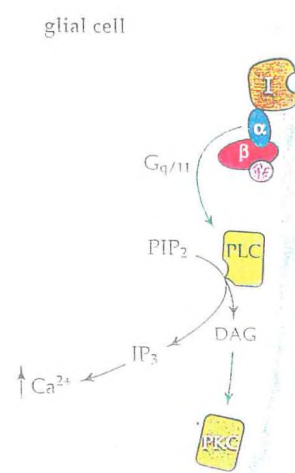
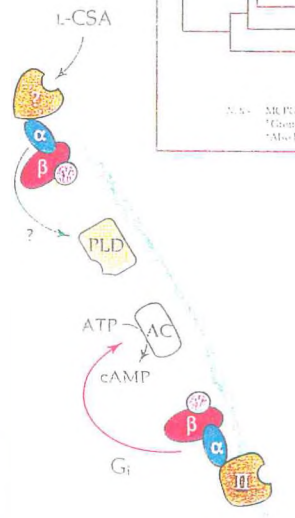


Figura 2. Receptores metabotrópicos

Figura 2. Os receptores metabotrópicos podem modular a transmissão sináptica via mecanismos pré e pós-sinápticos. A inibição da liberação de glutamato ocorre via ativação dos receptores pré-sinápticos do grupo mGlu II e III. Ao contrário, a ativação dos receptores pré-sinápticos do grupo I aumenta a liberação, e esta facilitação é aumentada pelo ácido araquidônico. Os receptores pós-sinápticos do grupo I medeiam a despolarização lenta e podem modular as correntes mediadas pelos receptores AMPA e NMDA e parecem estar envolvidos na LTP. A ativação destes receptores após insulto excitotóxico contribue para a morte celular, enquanto a ativação do grupo II e III produz efeitos neuroprotetores. Outros receptores mGlu além dos oito membros clonados já foram identificados, por exemplo, um acoplado à fosfolipase D (Toms et al., 1996).



A remoção rápida do glutamato da fenda sináptica por recaptção contribui para o término do sinal excitatório, manutenção dos níveis extracelulares de glutamato abaixo do que pode induzir citotoxicidade (Rosenberg *et al.*, 1992) e reciclagem do transmissor via ciclo da glutamina (Shank & Aprison, 1981). Já foi demonstrado um decréscimo no transporte de aspartato na doença de Alzheimer (Palmer *et al.*, 1986) e uma diminuição na velocidade máxima de recaptção do glutamato em sinaptosomas preparados de medulas espinhais de pacientes com esclerose amiotrófica lateral (Rothstein *et al.*, 1992). Tais déficits podem contribuir para a vulnerabilidade dos neurônios nestas doenças. Existem vários tipos de sistemas de transporte, que podem ser distinguidos com base na sua dependência iônica ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  ou  $\text{Ca}^{+2}$ ), no tipo celular (neurônio ou glia) e na localização anatômica (mesencéfalo ou cerebelo). O transporte dependente de  $\text{Na}^+$  na glia, parece ser o dominante e é o mais bem caracterizado em termos de farmacologia, distribuição, mecanismo e biologia molecular (Chamberlin & Bridges, 1993; Robinson *et al.*, 1993).

O metabolismo do glutamato é dividido, no mínimo, em dois compartimentos maiores, também chamados, pequeno e grande “pools” (Van den Berg & Garfinkel, 1971; Berl, 1973). O grande pool, está preferencialmente localizado nos neurônios, enquanto o pequeno pool, nas células gliais. A glutamina sintetase parece existir primariamente nas células gliais (Martinez-Hernandez *et al.*, 1977) e está ausente nos nervos terminais (Salganicoff & De Robertis, 1965), assim, a glutamina sintetizada na glia pode fluir para os neurônios (Benjamin & Quastel, 1972).

### 3. PAPEL FISIOLÓGICO DOS RECEPTORES NMDA

#### 3.1 CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO

A neurotransmissão no SNC é mediada principalmente pelo glutamato e compostos relacionados (Fonnum, 1984; Engelsen, 1986). A maioria do glutamato no cérebro, entretanto, está envolvida no metabolismo intermediário no neurônio e glia e somente uma fração do pool total de glutamato participa no sinal neuronal. Evidências sugerem que o glutamato tem influências tróficas na diferenciação neuronal e regula o desenvolvimento da citoarquitetura do neurônio. Além de participar na formação do circuito neuronal e na plasticidade sináptica. A adição de NMDA promove a sobrevivência de células granulosas cerebelares cultivadas, de uma maneira dose-dependente (Balazs *et al.*; 1988). E a suplementação de cultura de células neuronais de feto de ratos com glutamato (5 $\mu$ M) produz maturação (Arslan *et al.*, 1988). Comparado ao controle, ocorre um aumento da maturação nuclear, do número de mitocôndrias e retículo endoplasmático, indicando um aumento na capacidade de síntese proteica, que pode ser interpretado como um sinal de maturação neuronal avançada. Além disso, são observados um aumento do número de sinapses e de sua eficácia (Chang & Greenough, 1984). Os efeitos do glutamato no crescimento de neuritos foi demonstrado por Brewer e Cotman (1989), eles observaram que a extensão e as ramificações dos neuritos são controladas pela ativação do receptor NMDA. Assim, os resultados suportam a hipótese de que o glutamato tem um papel importante na formação e regulação do circuito neuronal, por um mecanismo ainda não estabelecido.

### 3.2 MEMÓRIA

Memória é a capacidade de reter e recuperar informações, um processo que produz alteração no nosso comportamento, permitindo que o indivíduo se situe no presente, considerando o passado e o futuro. Ela fornece as bases para todos os nossos conhecimentos, habilidade, sonhos, planos e anseios. Memória é, portanto, um aspecto central da existência humana. Assim, o conhecimento de sua natureza e bases biológicas é essencial para se entender a psiquê humana e desenvolver terapias relacionadas com as patologias que levam a alterações nas funções cognitivas. A pesquisa básica que investiga a neurobiologia da memória está centrada em dois objetivos. O primeiro visa à identificação de áreas cerebrais envolvidas neste fenômeno, bem como o papel dos sistemas cerebrais no controle do armazenamento dos diferentes tipos de memória. O segundo destina-se a elucidar as alterações celulares e bioquímicas que ocorrem entre neurônios durante a aquisição da informação.

Existem várias formas de aprendizagem e memória, envolvendo diferentes sistemas neuronais. Muitos trabalhos distinguem entre memória “declarativa” e “não declarativa” (ou “de procedimento”- *procedural*). A memória declarativa geralmente refere-se à memória explícita – de “o que” e está relacionada à experiências próprias, reconhecimento de cenas e objetos familiares. A memória não declarativa, de procedimento ou implícita – de “como fazer”, é a vasta maioria dos processos de memória em animais, mas também muitos aspectos da memória em seres humanos. Considera todos os seus gostos e desgostos, todos os hábitos e habilidades (p.ex. dirigir, nadar, andar de bicicleta) e pode incluir o fenômeno de identificação (*priming*), que pode ser definido como a habilidade de detectar ou identificar um estímulo como um resultado de uma exposição prévia (Thompson *et al.*, 1988). Estas categorias de memória não são excludentes, quando um organismo aprende alguma coisa importante, vários destes sistemas de memória podem ser empregados.

A memória não declarativa inclui o condicionamento clássico, habilidades e é em grande parte inconsciente. A declarativa envolve a recuperação consciente de eventos ou fatos ocorridos. Estes tipos de memória são processados em partes diferentes do cérebro mas podem ser interconvertidas. No homem a memória declarativa é dividida em recuperação imediata de eventos que ocorrem em curso, memória a curto prazo ou recente de eventos que ocorrem de segundo a horas ou dias antes, e memória remota de eventos do passado distante. A memória a curto prazo engloba o tempo durante o qual a memória de eventos em curso está sendo consolidada e convertida à memória remota, de longo prazo. Durante este tempo, a memória a curto prazo é vulnerável e sujeita a desaparecer, ao passo que as memórias remotas são extremamente resistentes e persistem na presença de grave lesão cerebral (Squire & Zola-Morgan, 1991).

Um aspecto da memória a curto prazo é a memória operacional (*working memory*), um armazenamento temporário de informação utilizado para planejar uma ação futura. Evidência clínica de vulnerabilidade da memória a curto prazo é a observação de que há com frequência perda da memória de eventos imediatamente antes de uma concussão cerebral (amnésia retrógrada), mas a memória retrógrada e a não declarativa não são afetadas. Em animais, a aquisição de resposta aprendidas, ou pelo menos sua recuperação, é impedida se dentro de 5 minutos após cada sessão de treinamento, os animais forem anestesiados ou tratados com antibióticos que inibam a síntese proteica. Quatro horas após a sessões de treinamento estes tratamentos não têm efeito sobre a aquisição (Squire & Zola-Morgan, 1991)..

Alguns pesquisadores argumentam que o corpo estriado está envolvido na codificação da memória não declarativa e existem outras evidências de que o cerebelo também está envolvido. Pesquisa recente sobre a memória operacional indica o envolvimento de muitas partes diferentes do córtex cerebral. Quando os indivíduos são solicitados a lembrar a localização espacial de estímulos visuais, a varredura por PET (*positron emission tomography*) mostra atividade aumentada no

córtex occipital, parietal e frontal direitos, o hipocampo não está envolvido (Squire & Zola-Morgan, 1991).

Por outro lado, o processo de codificação que converte memórias a curto prazo em memórias a longo prazo no homem e em outros primatas envolve o hipocampo e as porções adjacentes entorrinal, perirrinal e para-hipocampal do córtex temporal medial. No homem, a destruição bilateral do hipocampo ventral ou processos patológicos que destroem seus neurônios em CA1 causam defeitos acentuados na memória recente. Seres humanos com esta destruição mantêm intactas a memória imediata e a remota, eles não podem constituir novas memórias a longo prazo. As conexões do hipocampo para o diencéfalo também estão envolvidos com a memória. Alguns alcoólatras com lesão cerebral desenvolvem uma deficiência de memória recente, e a perda de memória correlaciona-se com alterações nos corpos mamilares, estes projetam-se para o tálamo anterior e, em macacos, lesões do tálamo causam perda de memória recente. Do tálamo, as fibras projetam-se para o córtex pré-frontal e dali para o prosencéfalo basal, deste, há uma projeção colinérgica para todo o neocórtex, amígdala e hipocampo, a partir do núcleo basal de Meynert. Enquanto o processo de decodificação para a memória a curto prazo envolve o hipocampo, as de longo prazo estão armazenadas no neocórtex (Squire & Zola-Morgan, 1991).

Talvez a primeira proposição da existência de alterações celulares subjacentes à formação de memórias tenha sido feita pelo psicólogo canadense Donald Hebb, no seu livro *Organization of Behavior*, publicado em 1949. Baseado nos trabalhos anatômicos de Lorente de Nó sobre a estrutura e as conexões entre neurônios, Hebb propôs que durante a situação de aprendizagem um neurônio estimula outro, de tal forma que a sinapse entre eles se torna mais fortalecida e isso poderia produzir alterações estruturais. De acordo com essa idéia, o armazenamento dessa informação estrutural poderia explicar o fenômeno da memória. Entretanto ele não tinha a menor idéia dos mecanismos neurais subjacentes à sua teoria.

Em 1973, os fisiologistas Timoty Bliss e Terje Lømo demonstraram em neurônios localizados no hipocampo (uma estrutura intimamente relacionada aos processos de memória) que a estimulação elétrica de alta frequência num axônio pré-sináptico durante alguns segundos produz um aumento na magnitude da resposta pós-sináptica. O aumento pode durar algumas horas em animais anestesiados ou vários dias ou mesmo meses em animais acordados. Este fenômeno foi denominado pelos pesquisadores de potenciação de longa duração (*long-term potentiation*- LTP).

Do ponto de vista funcional, a LTP corresponde a um processo de facilitação do sistema nervoso, cujo estabelecimento depende da duração e da frequência do estímulo repetitivo ou numa analogia, depende do “treinamento” e portanto, de um processo de aprendizagem. Esses fenômenos seriam a base para a teoria neuropsicológica proposta por Hebb. A ativação repetitiva dos receptores NMDA causa LTP (*long term potentiation*) (Bliss & Lomo, 1973; Brown *et al.*, 1990). LTP pode ser definido como uma forma de memória ou mecanismo de memória, é importante no hipocampo e amígdala (Clugnert & Le Doux, 1990), ambas as estruturas estão envolvidas no processamento dos estágios iniciais da memória (consolidação) e também no córtex, onde se acredita ser o sítio de estocagem da memória (Izquierdo, 1989; Keller *et al.*, 1990).

Algumas memórias tais como olfativa e espacial podem ser localizadas no hipocampo (Morris *et al.*, 1986; Staubli *et al.*, 1989). Animais e pacientes com ablação do hipocampo e amígdala não perdem a memória já adquirida (memória retrógrada) mas se tornam incapazes de reter novos conhecimentos, eles podem adquirir informação e retê-las por segundos ou minutos, mas não se torna uma memória de longa duração.

Os receptores NMDA são importantes para a indução mas não para a manutenção da LTP (Cotman *et al.*, 1988). A ativação destes receptores leva a abertura de canais de cálcio, este inicia um aumento persistente da transmissão sináptica por ativação de duas proteínas quinases dependentes de cálcio, a  $Ca^{+2}$ /Calmodulina quinase e a proteína quinase C e uma tirosina quinase. Assim a manutenção da LTP envolve um aumento pré-sináptico da liberação do transmissor glutamato (Figura 3 e 4), via liberação de um mensageiro retrógrado, possivelmente óxido nítrico (NO) ou monóxido de carbono (CO), estes se difundem para o terminal pré-sináptico para ativar um ou mais 2º mensageiros que agem aumentando a liberação de glutamato e manter a LTP (Gustafsson & Wigstrom, 1988, Hawkins *et al.*, 1983). A infusão intracerebroventricular de antagonistas do receptor NMDA, AP-5 ou MK-801, prejudica a indução da LTP (Morris *et al.*, 1986), a performance do aprendizado no teste do labirinto aquático (*Water maze*) e no teste de memória olfatória (Staubli *et al.*, 1989).

Os receptores NMDA obviamente não trabalham isolados no processo de memória. Neurônios colinérgicos, opióides e noradrenérgicos fazem sinapse na amígdala (McGaugh, 1989) e neurônios colinérgicos no hipocampo (Dunnett *et al.*, 1990) e gabaérgicos na amígdala e hipocampo (Figura 4). Na amígdala e no hipocampo receptores NMDA, muscarínicos e  $\beta$ -adrenérgicos cooperam e receptores benzodiazepínicos ( $GABA_A$ ) trabalham contra o processo de consolidação da memória (Izquierdo *et al.*, 1991).

### 3.2.1 Papel do sistema límbico na memória

Estudos farmacológicos e clínicos, têm mostrado que a memória explícita ou declarativa é processada por estruturas no lobo temporal e suas conexões. Acredita-se que a memória implícita ou de procedimento (*procedural*) seja processada pelo corpo estriado e/ou diencéfalo (Izquierdo, 1993c; Squire, 1987).

### Figura 3. Modelo de indução de *Long Term Potentiation* (LTP)

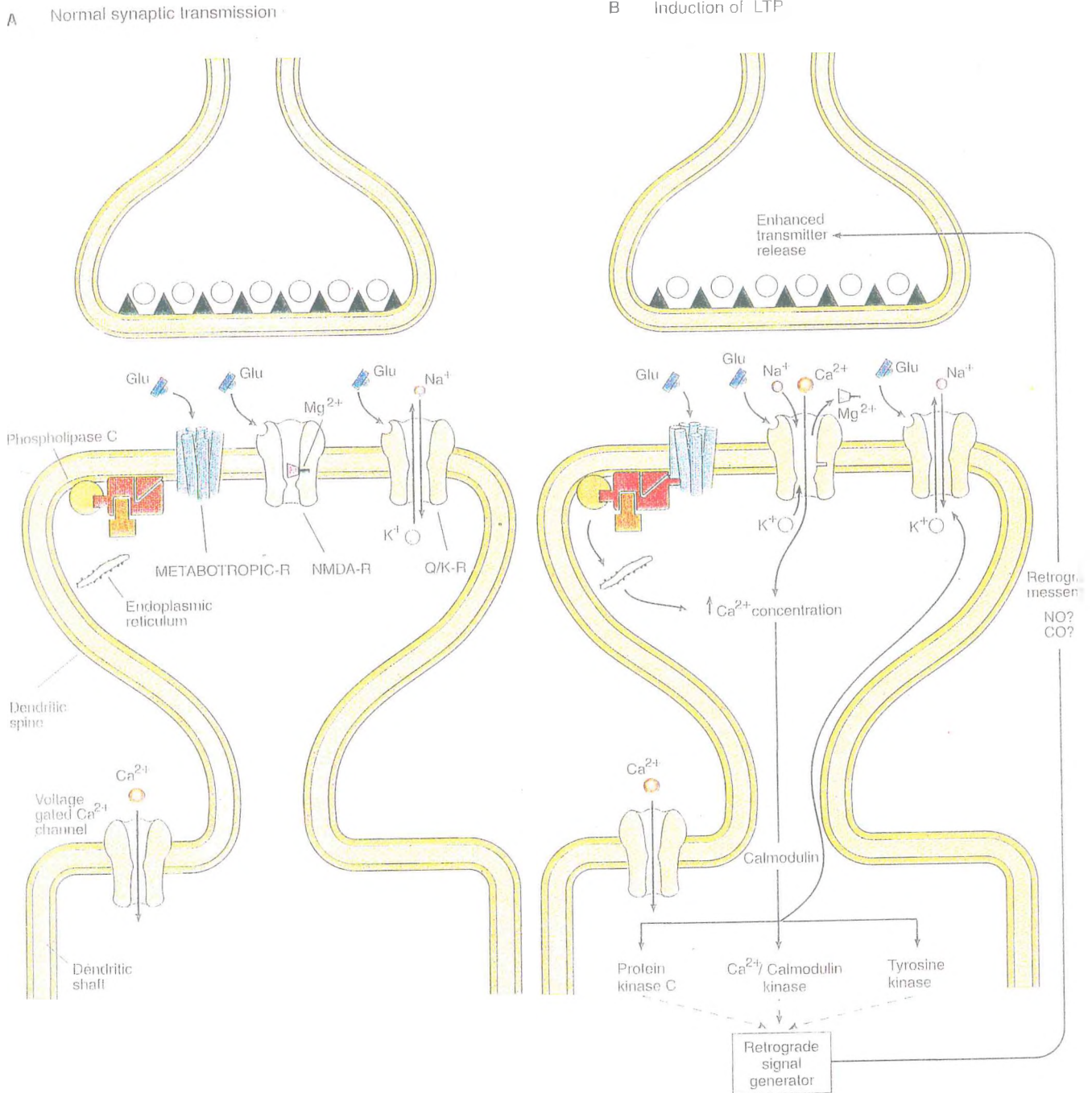


Figura 3. A- Durante a transmissão sináptica normal (baixa frequência), o glutamato é liberado do terminal pré-sináptico e age nos receptores NMDA-R e não NMDA (Q/K-R). O  $Na^+$  e  $K^+$  fluem através dos canais acoplados aos receptores não NMDA, mas não através do acoplado ao NMDA devido ao bloqueio pelo  $Mg^{2+}$ . B- Durante um estímulo tetânico de alta frequência, a membrana pós-sináptica é despolarizada pela ação do  $Na^+$  e  $K^+$  fluindo através dos canais acoplados aos receptores não NMDA, esta despolarização alivia o bloqueio do  $Mg^{2+}$  no canal-NMDA, provocando um influxo de  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Ca^{2+}$  através deste canal. O aumento do  $Ca^{2+}$  (via canal ou por liberação interna via ativação dos receptores metabotrópicos grupo I), ativa proteína quinase C,  $Ca^{2+}$ /calmodulina quinase e tirosina quinase, o que induz a LTP. Após a indução da LTP a célula



Figura 4. Circuito hipocampal e neurotransmissores envolvido na LTP

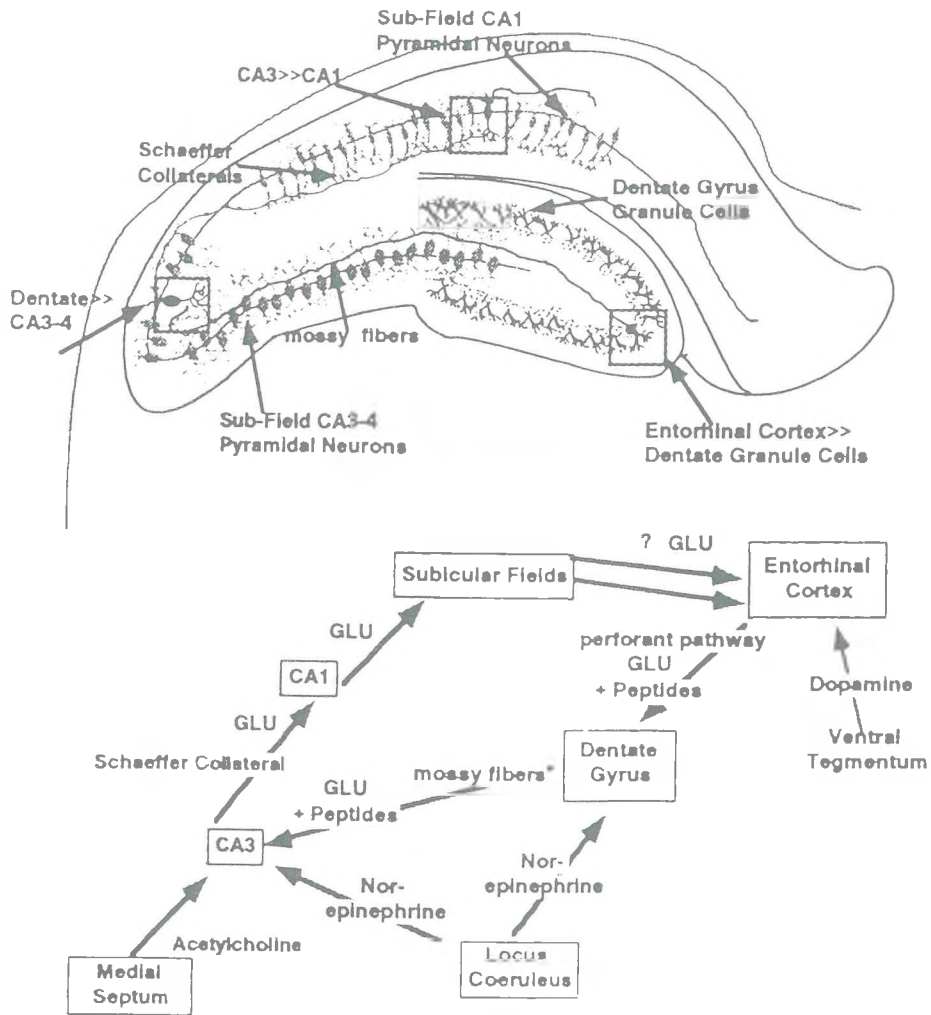


Figura 4. O circuito sináptico de fatia de hipocampo de rato em que a LTP (*long term potentiation*) foi obtida está indicado na parte superior da figura, enquanto os neurotransmissores associados com estes circuitos e as células capazes de expressar a LTP estão mostradas na parte inferior. Cada um dos três maiores circuitos (do córtex entorrinal ao giro denteado, deste ao CA3 e do CA3 ao CA1) mostram LTP similares, variando a farmacologia com a localização e caminho envolvido. O glutamato mediando os eventos sinápticos figura predominantemente. Segundo, Cooper *et al.*, 1996

Nem todas as memórias declarativas são processadas pelas mesmas estruturas (Cahil & McGaugh, 1990; Izquierdo & Medina, 1991; McDonald & White, 1994). Por exemplo, a memória da esQUIVA inibitória depende do hipocampo (HIP), amígdala (AMI) e septo medial (SM), a memória da habituação espacial depende somente do HIP (Izquierdo e cols, 1992, 1993) e a memória de estímulo (susto) condicionado (Davis & Cassell, 1994) ou esQUIVA da água motivado pelo choque (Cahil & McGaugh, 1990) depende da AMI.

A AMI (Brioni, 1993; Izquierdo e cols, 1992) e por extensão o SM (Izquierdo & Medina, 1991, Izquierdo *et al.*, 1993) (Figura 5) lida com a memória de alerta, ansiedade ou aversividade associada com cada evento. O SM e o HIP processa a memória de trabalho e a memória espacial. O HIP também processa a informação temporal, contextual e a memória que leva a recordação consciente em seres humanos (Brioni, 1993; Izquierdo, 1994; Izquierdo *et al.*, 1993).

O córtex entorrinal (CE) está interconectado com o o HIP, AMI, e o SM por caminhos aferentes e eferentes mono e polisinápticos (Nieuwenhuys, 1985; Witter *et al.*, 1989) e participa tanto da memória espacial, quanto do aprendizado da esQUIVA inibitória (Izquierdo, 1993; Zola-Morgan *et al.*, 1989). O CE é a parte do cérebro onde lesões são mais comumente encontradas na doença de Alzheimer (Hyman e cols, 1990). As lesões são usadas como marcadores precoces desta doenças e elas aumentam em número com a piora dos achados clínicos (De Leon *et al.*, 1993). Estudos usando infusões de muscimol e AP5, agonistas do receptor GABA<sub>A</sub> e NMDA, respectivamente, no CE mostraram que o CE registra informações aprendidas no momento da aquisição, mas não é essencial para aquisição (Ferreira *et al.*, 1992), entretanto ele é necessário para o processo de memória 90 a 180 minutos depois (tempo de consolidação), momento em que ele aparentemente integra memórias ou componentes da memória previamente processados pelo HIP, AMI ou SM (Ferreira *et al.*, 1992).

**Figura 5. Sistema límbico e suas vias aferentes e eferentes**

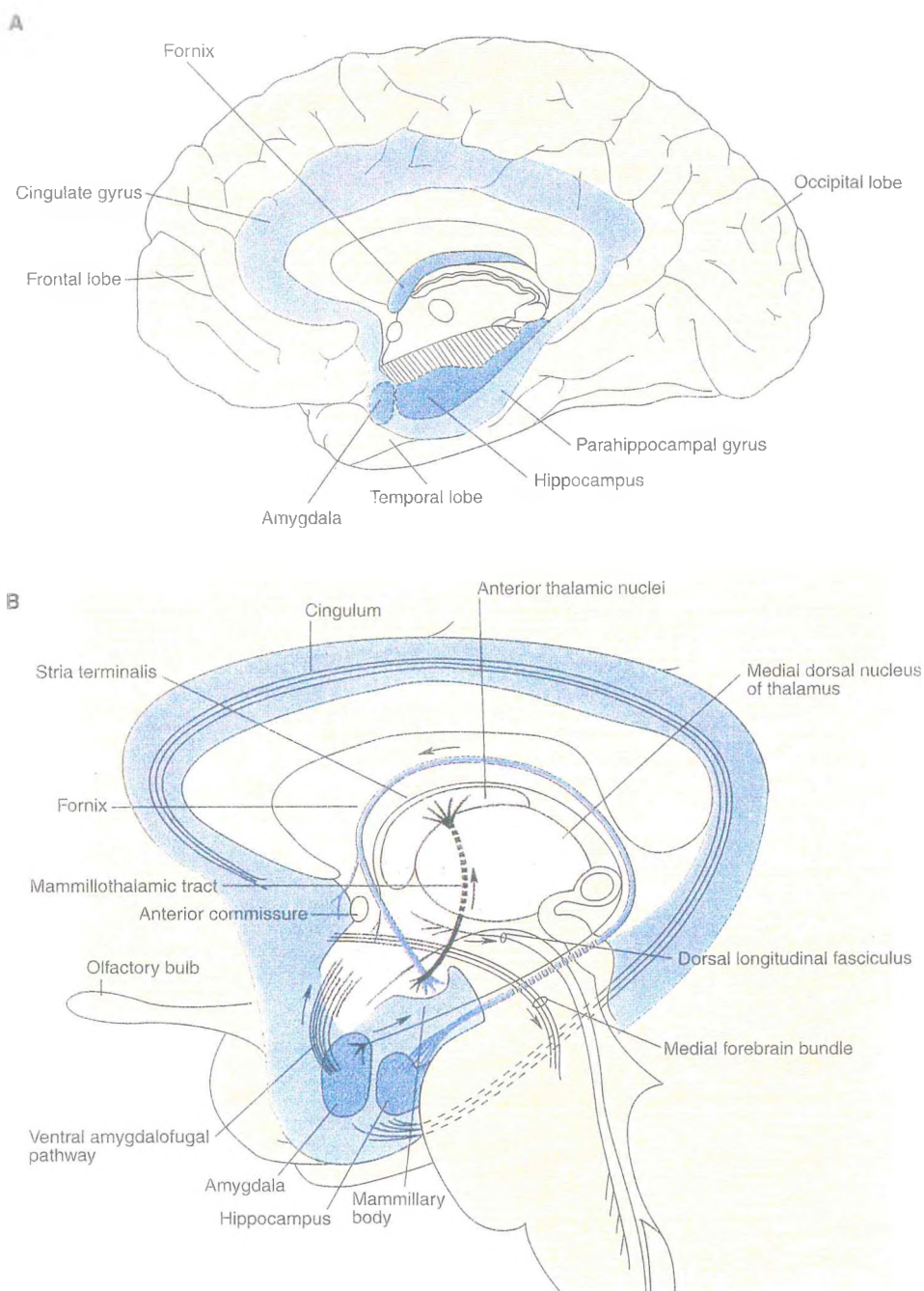


Figura 6. A- Vista sagital do cérebro mostrando o lobo límbico, que consiste do tecido cortical primitivo (área azul) que circula o tronco cerebral superior. B- Interconexões das estruturas profundas incluídas no sistema límbico. A direção predominante da atividade neural em cada trato está indicada por setas, mas a atividade no trato é tipicamente bidirecional, segundo Kandel e cols (1995).

### 3.2.2 Farmacologia da fase inicial da memória

Morris e cols. (1986) mostraram que a administração intracerebroventricular de AP5, em doses que bloqueiam a LTP hipocampal em ratos, diminui o aprendizado de uma tarefa espacial, no modelo do labirinto aquático. Vários autores reportaram que a administração sistêmica de bloqueadores de canal do receptor NMDA impede várias formas de aprendizado (Izquierdo, 1991, 1993). Em pintos, a esQUIVA INIBITÓRIA (um modelo de memória) é seguida por um aumento da ligação do glutamato ao receptor NMDA em estruturas envolvidas no processo de aprendizagem (Stewart *et al.*, 1992). E em ratos no modelo de esQUIVA INIBITÓRIA (*step-down inhibitory avoidance*), a infusão imediata após o treinamento, de AP5, muscimol ou escopolamina no hipocampo, amígdala ou septo medial causa amnésia retrógrada (Izquierdo *et al.* 1992).

### 3.2.3 A Bioquímica da formação da memória e sua regulação por hormônios e neuromoduladores

Dados da literatura têm mostrado que a bioquímica da formação e estocagem da memória declarativa envolve uma cascata de eventos em áreas específicas do cérebro que é similar as áreas da LTP no hipocampo (Baudry & Massicotte, 1992; Izquierdo, 1994; Izquierdo e Medina, 1995; Maren & Baudry, 1995; Sossin, 1996). A cascata bioquímica da memória tem sido estudada no hipocampo em conexão com a esQUIVA INIBITÓRIA (Izquierdo & Medina, 1995), muitos achados sugerem que ocorre no hipocampo, amígdala, septo medial e córtex entorrinal (Izquierdo & Medina, 1995). O envolvimento de uma ou outra área depende da tarefa. Na esQUIVA INIBITÓRIA, todas estas áreas participam de maneira coordenada ou sequencial, em outras tarefas, como habituação a um novo ambiente, a amígdala e/ou o septo medial

não estão aparentemente envolvidos (Brioni, 1993; Izquierdo, 1994; Zanatta *et al.* 1996).

A memória certamente não é formada ou consolidada somente em uma região (Da Cunha *et al.* 1992), se ela é estocada por longos períodos após aquisição em áreas restritas, é razão de debate e estudos intensos. O local ou locais envolvidos nesta estocagem varia grandemente com a natureza da informação e provavelmente muda com o tempo (Zanatta *et al.*, 1996).

A cascata bioquímica envolve primeiro uma ativação dos receptores AMPA, em muitos casos NMDA e em alguns casos metabotrópicos, seguidos por uma entrada pré e pós-sináptica de cálcio, que em muitos casos ocorre através do canal formado pelo receptor NMDA e em outros, através do canal de cálcio dependente de voltagem (Izquierdo & Medina, 1995; Nicoll & Malenka, 1995; Riedel, 1996). E, talvez acoplado com a liberação de óxido nítrico (NO) e o fator ativador de plaquetas (PAF), que aumenta a liberação pré-sináptica de glutamato. Estes eventos são seguidos por um rápido aumento no monofosfato de guanosil cíclico (GMPC) pós-sináptico, um lento aumento do monofosfato de adenosil cíclico (AMPC) (Huang *et al.* 1994; Bernabeu *et al.* 1996), por uma ativação pré e pós-sináptica da proteína quinase A e C e cálcio-calmodulina quinase II (Reymann, 1993) e pela fosforilação de uma variedade de proteínas, incluindo as subunidades do receptor NMDA (Koga *et al.* 1996) e da transcrição do gene do fator CREB (*c-AMP-responsive element binding protein*) (Yin & Tully, 1996), entre outros. A ativação gênica leva a síntese proteica que é necessária para a manutenção duradoura da LTP e da memória (Dunn, 1980; Huang *et al.*, 1994; Yin & Tully, 1996).

Os eventos iniciais desta cascata (ativação do receptor de glutamato) são bloqueados por agonistas do receptor GABA<sub>A</sub> (Brioni, 1993) e são modulados pelas sinapses colinérgicas muscarínicas e  $\beta$ -noradrenérgicas (Izquierdo *et al.*, 1992).

Alem disso os receptores GABA<sub>A</sub> são modulados por substâncias endógenas benzodiazepínicas-símile (Wolfman *et al.*, 1991). Os eventos tardios (3 ou 6 h após a ativação inicial dos receptores glutamatérgicos) são modulados por mecanismos dopaminérgicos, primeiro descritos por Grecksch e Matthies (1982). Em particular a última fase, que é dependente da síntese da proteína quinase A e CREB, é modulada pelos receptores D<sub>1</sub>/D<sub>5</sub>, tanto no caso da LTP na região CA1 hipocampal (Huang *et al.*, 1994), como no processamento da memória pelo hipocampo. Estes últimos eventos não ocorrem se a atividade da proteína quinase é inibida (Reymann, 1993; Izquierdo & Medina, 1994). Inibidores de síntese proteica ou a perda de genes que codificam algumas formas de CREB tem um efeito “abortivo” na LTP (Huang *et al.*, 1994; Yin & Tully, 1996).

Além dos sistemas já mencionados, uma variedade de sistemas centrais e periféricos alteram a formação da memória no período pós-treino imediato:  $\beta$ -endorfinas cerebrais e outros opióides, nicotína, serotonina, adrenocorticotropina, vasopressina, ocitocina, glicocorticóides, adrenalina e glicose (Izquierdo, 1989; Bohus, 1994; Cahil & McGaugh, 1996; Gold, 1991, 1995; Grigoryan *et al.*, 1996; Izquierdo & Medina, 1996). A maioria destas substâncias são liberadas no cérebro ou fora dele durante muitas formas de treinamento comportamental, o que significa que muitas ou a maioria das formas de memória são atualmente formadas sob a sua influência (Zornetzer, 1978; Izquierdo, 1989).

Agentes colinérgicos alteram a atividade da proteína quinase A, catecolaminas influenciam os níveis de AMPc e assim a atividade da proteína quinase A (Gold, 1995). Vasopressina e corticotropina influenciam os níveis de catecolaminas cerebrais (De Wied & Bohus, 1979). Vários dos processos modulatórios que acompanham o aprendizado e a consolidação da memória interagem um com outro. Assim, as  $\beta$ -endorfinas exercem geralmente efeitos amnésicos através de influências sobre sinapses  $\beta$ -noradrenérgicas e D<sub>2</sub>-

dopaminérgicas na amígdala (McGaugh, 1989), infusões intraseptais de  $\beta$ -endorfinas são também amnésicas (Bostock *et al.*, 1988). Além disso, já foram descritas interações colinérgicas muscarínicas e  $\beta$ -noradrenérgicas na amígdala (Dalmaz *et al.*, 1993; Introini-Collison *et al.*, 1996) e no hipocampo e septo medial (Izquierdo *et al.*, 1992), relevante para a modulação da memória.

Existem fortes evidências de que a corticotropina (Gold, 1991), glicocorticóides (Roozendaal & McGaugh, 1996) vasopressina e ocitocina (De Wied & Bohus, 1979) causam seus efeitos na memória através de interações com mecanismos noradrenérgicos na amígdala e hipocampo. Existem receptores específicos para os glicocorticóides no hipocampo, amígdala e outras regiões do cérebro e evidências indicam que no mínimo em parte seus efeitos na memória podem ocorrer diretamente através destes receptores (De Kloet *et al.*, 1991; McEwen & Sapolsky, 1995; Roozental & McGaugh, 1996). Opióides e antagonistas opióides administrados periféricamente alteram a memória principalmente através de influências na amígdala (McGaugh, 1989; Izquierdo, 1989). Epinefrina periférica regula a glicemia e o aumento na glicose sanguínea mimetiza os efeitos facilitatórios da epinefrina na memória (Gold, 1995; Gold & McMarty, 1995) e aumenta a LTP hipocampal (Gold *et al.*, 1984). Estudos em humanos e animais demonstram que a glicose sanguínea é um dos maiores fatores modulatórios nos processos de memória e eventos neurais relacionados (Gold, 1995; Golg & McCarty, 1995).

É provável que as mudanças pós-treino relatadas nos níveis de nucleotídeos cíclicos (Bernabeu *et al.*, 1996), atividade da proteína quinase (Bernabeu *et al.*, 1997), ligação ao receptor AMPA (Cammarota *et al.*, 1995; Tocco *et al.*, 1992) e síntese proteica (Dunn, 1980; Izquierdo *et al.*, 1983), sejam efeitos secundários dos fatores modulatórios e em particular, aumentos na síntese proteica que ocorrem em várias regiões do cérebro após o treinamento, podem ser abolidos após

adrenalectomia e mimetizados por corticotropina e por adrenalina (Dunn, 1980; Izquierdo *et al.*, 1983).

A relevância das influências modulatórias em cada região do cérebro obviamente depende do tipo de memória sendo processada. O hipocampo é um sítio de ação de influências modulatórias em muitos tipos de memória ou componentes de memória: espacial, verbal e contextual, entre outros (Bechara *et al.*, 1995; Izquierdo & Medina, 1995). A amígdala (Bechara *et al.*, 1995; Izquierdo *et al.*, 1992; Young *et al.*, 1995) e o septo medial (Davis, 1992; Izquierdo & Medina, 1995) estão implicadas nos aspectos da memória emocional e aversiva. Além disso, o septo medial está envolvido na memória espacial (Bostock *et al.*, 1988; Brioni *et al.*, 1990). Alguns dados sugerem que o papel principal da amígdala pode ser realmente modular memórias estabelecidas no hipocampo e outros locais, particularmente no núcleo caudato (Cahil & McGaugh, 1996; McGaugh *et al.*, 1995). O córtex entorrinal e parietal parecem estar envolvidos nos processos tardios de uma variedade de memórias, possivelmente como integrador de dados previamente processados pelo hipocampo, amígdala e septo medial (Zanatta *et al.*, 1996). Hipocampo, amígdala, septo e neocórtex são conhecidos por receberem inervação noradrenérgica, dopaminérgica e colinérgica e cuja falência pode ser atribuída a um papel na gênese de distúrbios de memória relacionados a idade ou a doenças degenerativas do cérebro, tais como as doenças de Parkinson e Alzheimer (Winblad *et al.*, 1985; Izquierdo *et al.*, 1992).

É conhecido que a mais simples forma de aprendizagem e memória está situada em mais de uma estrutura. A habituação da exploração de um ambiente fechado requer o hipocampo e o córtex entorrinal e não a amígdala ou o septo (Izquierdo *et al.*, 1992; Izquierdo & Medina, 1995). A esquia inibitória requer as quatro estruturas e subsequentemente o córtex parietal posterior (Izquierdo *et al.*, 1992; Izquierdo & Medina, 1995; Zanatta *et al.*, 1996), O condicionamento de piscar



os olhos (*eye-blink*) é formado em um circuito que envolve principalmente o cerebelo (Thompson & Krupa, 1994), mas é acompanhado por mudanças na ligação ao receptor AMPA no hipocampo (Tocco *et al.*, 1992) que são muito similares aos descritos para a esquivia inibitória (Cammara *et al.*, 1995) ou LTP (Tocco *et al.*, 1992). O susto condicionado necessita da amígdala antes do hipocampo, mas requer a ativação de um complexo circuito (Davis, 1992). Ele pode ser atenuado pelo condicionamento alimentar Pavloviano, indicando que muitos caminhos diferentes são usualmente empregados neste tipo de aprendizado (Schmid *et al.*, 1995). Componentes separados de tarefas de aprendizado estão sendo reconhecidos e cada um pode requerer diferentes estruturas cerebrais e envolver diferentes mecanismos neurais (Grant & Silva, 1994; Izquierdo & Medina, 1995; McGaugh *et al.*, 1995). E recentemente um componente espacial da tarefa do labirinto aquático, insensível ao AP5 foi descrito (Bannerman *et al.*, 1995). O estudo das influências dos sistemas modulatórios na cadeia bioquímica de eventos durante a plasticidade cerebral e memória pode abrir caminho não somente para um melhor conhecimento da memória, mas também para o tratamento de suas desordens e de uma variedade de doenças cerebrais que são acompanhadas de distúrbios de cognição.

## 4. EXCITOTOXICIDADE

### 4.1 PAPEL DO CÁLCIO

A ativação de receptores do glutamato induz a elevação da concentração de cálcio intracelular. A ligação do glutamato a receptores NMDA resulta na abertura de canais de cátions permeáveis ao cálcio (Choi, 1987). Este aminoácido ao se ligar ao receptor AMPA induz o influxo de  $\text{Na}^+$ , resultando em despolarização da membrana e abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem (VDCC) na membrana plasmática. O glutamato ao se ligar aos receptores metabotrópicos ativam

a fosfolipase C, resultando na liberação de IP<sub>3</sub>, este ativa canais de cálcio no retículo endoplasmático, enfim, a ativação de todos os tipos de receptores do glutamato contribuem para a grande elevação de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>.

Muitos estudos mostram que o cálcio está envolvido no dano neuronal induzido pelo glutamato, a remoção do cálcio extracelular protege células do neocórtex (Choi, 1987) e hipocámpais (Mattson *et al.*, 1988) contra a excitotoxicidade do glutamato, demonstrando o requerimento do influxo de cálcio na ação do glutamato. O bloqueio dos VDCC, com nifedipina pode atenuar esta excitotoxicidade (Weiss *et al.*, 1990). Também o dantrolene, um bloqueador da liberação de cálcio do retículo endoplasmático pode causar este efeito (Frandsen & Schousboe, 1991). Os caminhos pelos quais o cálcio produz este efeito não estão bem definidos. O cálcio ativa proteases que degradam o citoesqueleto e outras proteínas. A exposição de células hipocámpais a aminoácidos excitatórios causa proteólise, mediada pela calpaína, da proteína do citoesqueleto, espectrina (Simon & Noszek, 1988), entretanto Manev e cols. (1991), demonstraram que inibidores de calpaína não conferem excitoproteção. Além disso, a ativação da óxido nítrico sintase pela calmodulina cálcio-dependente, com elevação de radicais livres, pode contribuir para o dano induzido pelo cálcio (Jesberger & Richardson, 1991; Oyama *et al.*, 1993). Os neurônios possuem vários mecanismos para manter baixo a [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>. Na membrana plasmática existem bombas de cálcio dependentes de ATP e trocadores de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>+2</sup> que fazem a extrusão de cálcio. Um bloqueio nestes sistemas provoca um aumento nas concentrações de cálcio com injúria celular (Cheng & Mattson, 1992).

## 4.2 PAPEL DO GLUTAMATO NA ISQUEMIA CEREBRAL

A superestimulação do receptor do glutamato é um dos mecanismos para o dano neuronal que ocorre em várias condições neurológicas, incluindo isquemia

cerebral, trauma do SNC (Rothman & Olney, 1986; Albers & Goldberg, 1989; Meldrum, 1990) e doenças neurodegenerativas crônicas (Greenamyre & Young, 1989; Albin *et al.*, 1990; Olaitakis, 1990). Vários trabalhos demonstram esta hipótese. Em modelos de isquemia cerebral focal e global, os níveis de glutamato e aspartato aumentam massivamente durante os períodos de isquemia nas áreas afetadas (Benveniste *et al.*, 1984; Hillered *et al.*, 1989). A remoção dos aferentes glutamatérgicos atenuam o dano neuronal no hipocampo e núcleo estriado (Pulsinelli, 1985), sugerindo uma relação causal entre a excessiva liberação de glutamato e a morte neuronal. Entretanto, o argumento mais persuasivo em favor do papel do glutamato no mecanismo de patogênese da isquemia cerebral, é a demonstração de que o tratamento com antagonistas glutamatérgicos agindo no receptor NMDA e AMPA/cainato, atenua a neurodegeneração pós-isquêmica, em modelos de isquemia focal, em diferentes espécies (Meldrum, 1990; McCulloch & Iversen, 1991; Scatton *et al.*, 1991; Smith & Meldrum, 1993).

Como consequência da interrupção focal do suprimento sanguíneo para o cérebro, uma variedade de eventos celulares, metabólicos e bioquímicos ocorrem. Como a interrupção do metabolismo oxidativo, o que leva a falência energética e distúrbios na homeostase iônica. Danos na recaptação neuronal e glial de glutamato (devido a falência energética) e aumento da liberação sináptica de glutamato (devido ao aumento do potássio extracelular), levando a uma superestimulação dos receptores glutamatérgicos, com massiça entrada de cálcio (e sódio) em níveis tóxicos. O influxo de sódio leva a um aumento do conteúdo de água na célula (edema citotóxico), o que leva ao dano celular (Choi, 1987). A entrada descontrolada de cálcio inicia uma cascata complexa de eventos bioquímicos deletérios que podem levar à morte neuronal em áreas fora do foco isquêmico (zona de penumbra) (Choi, 1988a). Além disso, o aumento do cálcio ativa proteases intracelulares (como a calpaína I e II), endonucleases, NO sintase e fosfolipase A2,

estas duas últimas levando à formação de espécies reativas de oxigênio, causando danos irreversíveis à citoarquitetura dos neurônios (Scatton, 1994).

## 4.2 ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO), primeiramente identificado como fator de relaxamento derivado do endotélio (Moncada *et al.*, 1989; Ignaro, 1990), é também um importante neurotransmissor (Gartwaite, 1991; Snyder & Bredt, 1991). O papel fisiológico para o NO no sistema nervoso foi estabelecido pela demonstração de que derivados da arginina, potentes e seletivos inibidores da óxido nítrico sintase (NOS), bloqueiam o relaxamento do intestino mediado pelo SNC (Ramagopal & Leighton, 1989; Bult *et al.*, 1990) e a estimulação da formação de GMPc no cerebelo (Garthwaite *et al.*, 1989; Bredt & Snyder, 1990;). NO é formado da arginina no cérebro e células endoteliais pela NOS, que já foi purificada (Bredt & Snyder, 1990) e clonada (Bredt *et al.*, 1991) de cérebro de ratos. Macrófagos e outras células sanguíneas também produzem NO, que medeia seus efeitos bactericidas e tumoricidas (Hibbs *et al.*, 1987). Entretanto a NOS dos macrófagos é uma proteína diferente do cérebro e células endoteliais, diferindo nos requerimentos de cofatores. Estudos de imunocitoquímica localizaram NOS de populações seletivas de células neuronais, como também em neurônios na retina, medula adrenal, intestinos e fibras nervosas na neurohipófise (Bredt *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1991).

Evidências indicam que o NO pode mediar a neurotoxicidade em cultura de neurônios e N-arginina e Me-arginina, inibidores seletivos da NOS, previnem a morte celular mediada por glutamato, sendo este efeito revertido pela L-arginina. Além disso, a geração de NO por exposição a nitroprussiato de sódio produz morte celular com um efeito correspondendo a habilidade do nitroprussiato de sódio de

estimular a formação de GMPc, um efeito que é mediado pelo NO (Dawson *et al.*, 1991).

Em cerebelo de ratos adultos, toda a atividade da NOS requer cálcio, sugerindo que existe uma contribuição negligenciável de uma enzima macrófago-símile (Bredt & Snyder, 1990). Se NOS neuronal medeia a neurotoxicidade do glutamato é importante determinar quais neurônios possuem NOS. No córtex cerebral a imunorreatividade é confinada a uma população discreta de neurônios, compreendendo 1-2% da população total de neurônios (Bredt *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1991). Recentemente foi demonstrado que neurônios com atividade de NOS no cérebro se coram seletivamente para nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADPH) diaforase (Snyder & Bredt, 1991; Dawson *et al.*, 1991). Neurônios contendo NADPH diaforase são seletivamente resistentes a degeneração na doença de Huntington (Ferrante, 1985), doença de Alzheimer (Kowall & Beal, 1988), na injúria cerebral isquêmica (Uemura *et al.*, 1990) e na resposta a neurotoxinas (Koh & Choi, 1988; Koh *et al.*, 1986). Assim algumas características de neurônios que contém NOS são resistentes a várias formas de neurotoxicidade induzidas pelo glutamato. Se NOS neuronal provém o NO que media a neurotoxicidade do glutamato, então estes neurônios NOS/NADPH diaforase são sua origem. Koh e Choi (1988) mostraram que estes neurônios em cultura primária de células corticais resistem a neurotoxicidade do NMDA mas são mais susceptíveis que outros neurônios a toxicidade ao cainato e quisqualato. Doses baixas de quisqualato que matam seletivamente neurônios NOS/NADPH diaforase, reduzem a toxicidade de NMDA administrado subsequentemente, sugerindo que estes neurônios medeiam a toxicidade do NMDA em outros neurônios. O mecanismo pelo qual NO mata células é desconhecido. A formação de radicais livres está implicado em várias formas de neurotoxicidade (Choi, 1990; Meldrum & Garthwaite, 1990) e NO é um radical livre. NO pode também reagir com superóxido para produzir perioxinitrato, que é extremamente reativo (Beckman *et al.*, 1990) e pode inibir a respiração mitocondrial, diminuindo a habilidade das células para suportar o estresse oxidativo.

## 5. PAPEL DAS CÉLULAS NÃO NEURONAIS DURANTE O DANO CEREBRAL

### 5.1 ASTRÓCITOS

Os astrócitos revestem toda a estrutura neuronal e vascular (Miller & Szigeti, 1991). Dentre as funções normais no SNC podemos destacar, a manutenção da homeostase do potássio (redistribuição para os locais de baixa concentração ou para o espaço vascular) (Gardner-Medwin, 1983); o metabolismo do CO<sub>2</sub> (manutenção do pH extracelular nos limites normais) (Kimelberg & Bourke, 1982); a recaptação de vários neurotransmissores, tais como glutamato e GABA (Tang & Orkand, 1986). Poucos segundos após a injúria podem ser observados nos astrócitos um aumento de volume (Kimelberg *et al.*, 1990), após algumas horas podem-se observar, aumento na expressão da GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) (Lindsay, 1986; Murray *et al.*, 1990), expressão de proteínas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC tipo I e II) (Fontana *et al.*, 1984; Olsson *et al.*, 1987; Johns *et al.*, 1992) e finalmente, após dias se observa hipertrofia, proliferação e migração dos astrócitos (Del Rio *et al.*, 1991; Miyake *et al.*, 1992).

### 5.2 MICROGLIA E MACRÓFAGOS PERIVASCULARES

Células com a capacidade de fagocitose estão presentes no SNC e esta capacidade é prontamente ativada no local da injúria, resultando na morte celular ou processo de degeneração celular. Além disso, o dano pode atrair macrófagos do sangue. O termo “microglia ramificada” é aplicado aos macrófagos com uma forma característica no parênquima cerebral. Estudos sugerem que estas células derivam de macrófagos do sangue (Ling & Wong, 1993), assim a microglia seria somente um componente da população de macrófagos cerebrais, com uma população de

macrófagos perivasculares separados do parênquima pela lâmina basal (derivados dos monócitos do sangue), servindo como células apresentadoras de antígenos e interagindo com o sistema imune (Lassmann *et al.*, 1993).

Os macrófagos fagocitam os fragmentos celulares que se formam, as microglias ativadas podem liberar citocinas, tais como, interleucina-1, que podem agir nas células endoteliais aumentando a adesão destas aos macrófagos e leucócitos (Pober & Cotran, 1990). Além disso, os macrófagos podem matar células normais (Giulian *et al.*, 1993) e também lisar oligodendrócitos aparentemente por gerar radicais livres e induzir a peroxidação lipídica (Merril & Zimmerman, 1991).

### 5.3 CÉLULAS ENDOTELIAIS

O papel das células vasculares endoteliais na barreira hematoencefálica é bem estabelecido. Sabe-se que as junções fechadas (*tight junctions*) entre as células endoteliais formam uma barreira aos movimentos de íons e solutos no espaço extracelular do sangue para o cérebro e do cérebro para o sangue (Brightman & Reese, 1969). O sistema de transporte mediado por carreador forma a base do movimento seletivo de açúcares e aminoácidos do sangue para o cérebro. As células endoteliais cerebrais contribuem para a formação do fluido extracelular, possuindo também a capacidade de alterar a permeabilidade vascular (Betz & Goldstein, 1986). A permeabilidade destas células no cérebro pode ser influenciada pela interação com astrócitos (Stewart & Wiley, 1981). Além disso, um meio condicionado de cultura de astrócitos na presença de um indutor de AMPc irá suportar a formação de junções fechadas por células endoteliais cerebrais em cultura. Um dos aspectos da resposta dos astrócitos ao dano em cérebro de adultos pode ser devido à recuperação da permeabilidade da barreira hematoencefálica características das células endoteliais. A interação dos astrócitos com as células endoteliais pode envolver fatores específicos. Assim, células endoteliais podem liberar PDGF (fator de crescimento

derivado das plaquetas), que parecem agir nos astrócitos e não nas células endoteliais (Heldin *et al.*, 1981).

Nos tecidos periféricos, as células endoteliais são componentes da resposta inflamatória, a expressão de proteínas específicas associadas à membrana, como moléculas de adesão podem estar envolvida na penetração no cérebro de células do sistema imune e macrófagos durante o processo de desmielinização (Yednock *et al.*, 1992) ou durante à injúria, em extensão, esta mudança na adesão das células endoteliais podem induzir a liberação de citocinas pela microglia (Poher & Cotran, 1990).

## 6. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS CONTRA A EXCITOTOXICIDADE

Os neurônios que possuem receptores para o glutamato apresentam receptores para outros neurotransmissores como também para fatores neurotróficos, citocinas e outros neuromoduladores. Estudos em cultura de células neuronais demonstram que estes neuromoduladores podem influenciar a excitotoxicidade induzida pelo glutamato. Por exemplo, acetilcolina agindo em receptores M<sub>1</sub> potencia a excitotoxicidade em neurônios hipocampais de rato (Mattson, 1989) e a escopolamina, um antagonista muscarínico atenua o dano neuronal e déficits comportamentais induzidos por isquemia cerebral (Jenkins *et al.*, 1988). De fato, Buchon e Pulsinelli (1990) demonstraram que o bloqueio dos impulsos colinérgicos para o hipocampo protegem neurônios da região CA1 do dano isquêmico.

A ativação do receptor do GABA (por GABA e diazepam) protege os neurônios hipocampais da excitotoxicidade (Mattson & Kater, 1989). Muitos fatores neurotróficos mostram atividade excitoprotetora, tais como, fator de crescimento derivado do fibroblasto e fator de crescimento derivado do nervo (Mattson & Scheff, 1994). Também já está demonstrado que a proteína precursora  $\beta$ -amilóide



( $\beta$ -APP) pode proteger neurônios hipocâmpais da excitotoxicidade e isquemia cerebral (Mattson, 1994; Smith-Swintosky *et al.*, 1994).

Várias drogas já têm demonstrado eficácia em proteger cultura de células neuronais contra a excitotoxicidade. Entre elas, os antagonistas de receptores do glutamato, como o APV (D-2-amino-5-fosfonovalerato) (Mattson *et al.*, 1993), felbamato (Lipton, 1993), MK-801 (dizocilpina) (Weller *et al.*, 1993) e os antagonistas colinérgicos que apresentam ação excitoprotetora *in vitro* (Mattson, 1989) e *in vivo* (Olney *et al.*, 1991). Além destas, agonistas gabaérgicos, como diazepam (Mattson & Kater, 1989; Olney *et al.*, 1991), antidepressivos tricíclicos como a amitriptilina (McCarlin *et al.*, 1992), anticonvulsivantes como a fenitoína, carbamazepina (Mark *et al.*, 1994; Taft *et al.*, 1989) também apresentam esta ação.

Os metabólitos do ácido araquidônico podem desempenhar um papel na excitotoxicidade, como também nas respostas fisiológicas ao glutamato. Massicotte e cols (1990) mostraram que o inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub>, brometo de bromofenacil reduz a LTP no hipocampo. Foi demonstrado também, que o ácido nordi-hidroguaiarético, um outro inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> e lipoxigenase, têm a capacidade de proteger culturas de células hipocâmpais contra a excitotoxicidade pelo glutamato.

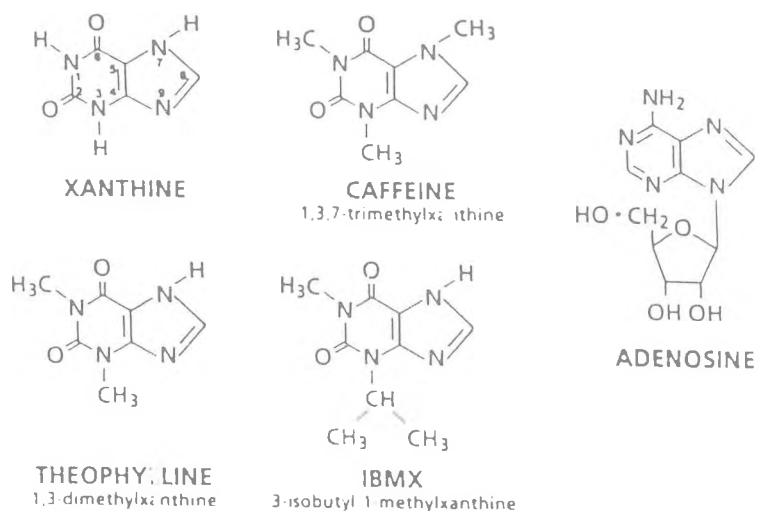
O potencial terapêutico contra danos isquêmicos/excitotóxicos de drogas que afetam os níveis de nucleotídeos cíclicos, ainda não foi estudado profundamente *in vivo*. Estudos demonstram que os nucleotídeos cíclicos (formados como segundos mensageiros) são excitoprotetores. Em culturas de células hipocâmpais agentes que elevam o AMP<sub>c</sub> (ex: foscolina), protegem neurônios contra a toxicidade pelo glutamato (Mattson & Kater, 1988), além disso Garthwaite e Garthwaite (1988), mostraram que o GMP<sub>c</sub> pode ser excitoprotetor. Já foi demonstrado que o glutamato estimula a produção de GMP<sub>c</sub>, via ativação da cálcio-calmodulina e da óxido nítrico

sintase. Talvez a ativação do sistema  $GMP_c$  seja um mecanismo para prevenir a elevação sustentada do  $[Ca^{+2}]_i$ . Fatores neuroprotetores endógenos podem utilizar o sistema  $GMP_c$ , por exemplo, um precursor da proteína  $\beta$ -amilóide, protege neurônios hipocâmpais contra danos excitotóxicos, por um mecanismo que aparentemente envolve a supressão do influxo de cálcio mediado pelo  $GMP_c$  (Mattson *et al.*, 1993; Barger *et al.*, 1995). Agentes que podem ser efetivos contra danos isquêmicos incluem análogos dos nucleotídeos cíclicos, como dibutilil- $AMP_c$  ou 8-bromo- $GMP_c$ , ativadores da adenililciclase como, forskolina e inibidores de fosfodiesterase como os derivados da isobutil-metilxantinas. Estes últimos estão sendo estudados como agentes terapêuticos em várias condições patológicas nas quais as células não neuronais são afetadas (Murray & England, 1992) e podem ser usados como agentes excitoprotetores.

## 7. METILXANTINAS

As metilxantinas, entre elas a cafeína e teofilina (Figura 6), exercem uma variedade de ações farmacológicas centrais e periféricas. Elas têm efeitos antiasmáticos, causam relaxamento dos músculos lisos, são estimulantes do SNC e músculos cardíacos e têm ações diuréticas (Arnaud, 1987; Rall, 1990). Após o descobrimento do sistema  $AMP_c$  (aproximadamente em 1960) e a observação de que as metilxantinas podem inibir a atividade da fosfodiesterase e elevar os níveis de  $AMP_c$  na célula, particularmente após a estimulação por hormônios ou neurotransmissores; as diversas ações das metilxantinas foram entendidas em termos da inibição da fosfodiesterase (Richie, 1975). Esta hipótese foi atrativa devido a ubiquidade do  $AMP_c$  e das fosfodiesterases o que explicaria porque as metilxantinas afetam diferentes tecidos. Entretanto estas ações requerem concentrações de 0,1 a 1,0 mM e doses terapêuticas ou a ingestão de cafeína e teofilina em infusões os níveis plasmáticos são geralmente de 10 a 50  $\mu M$ .

**Figura 6. Estrutura química das metilxantinas**



As metilxantinas agem como antagonistas dos receptores da adenosina em doses de 10 a 100  $\mu\text{M}$  e o antagonismo de várias ações da adenosina são consideradas como o mecanismo pelo qual as metilxantinas exercem suas ações (Fredholm, 1980; Phillis & Wu, 1981; Daly, 1982; Rall, 1982). Este mecanismo parece estar implicado nas ações da cafeína e teofilina em humanos (Biaggioni *et al.*, 1991). Outras ações, tais como a inibição da fosfodiesterase e a mobilização de cálcio, apresentam uma menor probabilidade de contribuição para as ações farmacológicas da cafeína, em vista das altas doses requeridas para produzir estes efeitos. Entretanto estas ações podem contribuir para a farmacologia da cafeína em certos locais quando a via de administração proporciona altas concentrações da droga. Alternativamente, tais ações podem contribuir para os efeitos tóxicos destes agentes.

## 7.1 AÇÕES DAS METILXANTINAS

### 7.1.1 Antagonismo de receptor da adenosina

Os receptores purinérgicos são classificados como nucleosídios (P1) ou nucleotídios (P2) (Burnstock, 1978). Os receptores da adenosina (P1) são classificados como A1, A2A, A2B e A3. A classificação original foi baseada no seu efeito no sistema adenililciclase: doses baixas de adenosina inibem a adenililciclase e diminuem os níveis de AMPc via receptor A<sub>1</sub> e altas doses tem efeitos opostos via receptor A2 (Londos & Wolff, 1977; van Calker *et al.*, 1979; Fredholm, 1994). As metilxantinas agem como antagonistas competitivos dos receptores da adenosina e o antagonismo de várias ações da adenosina é considerado como sendo um dos principais mecanismos pelos quais a cafeína e a teofilina exercem suas ações (Fredholm, 1980; Daly, 1982; Biaggioni *et al.*, 1991). O antagonismo da cafeína é observado em concentrações que variam de 10 a 100 µM, com pouca seletividade para os receptores A1 ou A2 (Bruns *et al.*, 1986). Numa faixa de concentração de 10 a 300 µM a cafeína e a teofilina bloqueiam os efeitos de agonistas da adenosina nos receptores A1 e A2 pré e pós-sinápticos no sistema nervoso central e periférico (Ribeiro, 1991). O receptor do tipo A3 é sensível à concentrações similares de metilxantinas (Ribeiro & Sebastião, 1986).

### 7.1.2 Inibição da fosfodiesterase

As metilxantinas são conhecidas há muito tempo pela sua capacidade de inibir a atividade da fosfodiesterase (Sutherland & Rall, 1958; Butcher & Sutherland, 1962) Multiplas formas de fosfodiesterase existem, diferindo na sua especificidade pelo substrato (AMPc ou GMPc), localização subcelular (solúvel ou ligado à membrana) e sensibilidade à Ca<sup>2+</sup>/calmodulina (Weishaar *et al.*, 1985; Nicholson *et al.*, 1991a). Estas formas foram recentemente classificadas em cinco subfamílias (Beavo & Reifsnnyder, 1990; Nicholson *et al.*, 1991a).

Embora formas diferentes de fosfodiesterase possam ser inibidas diferentemente por vários agentes (Weishaar *et al.*, 1985; Nicholson *et al.*, 1991), cafeína e teofilina inibem as formas de fosfodiesterase de tecido cerebral, dependente e independente de cálcio e solúvel e ligada a membrana, com concentrações que produzem 50% de inibição entre 0,48 a 0,75 mM para cafeína e 0,35 a 1,00 mM para teofilina (Smellie *et al.*, 1979; Choi *et al.*, 1988). A inibição da fosfodiesterase pela cafeína geralmente requer concentrações de 0,1 a 1,0 mM, que tipicamente excede as concentrações observadas no sangue após uma dose oral. Entretanto, uma quantidade limitada de inibição da fosfodiesterase pode ocorrer em concentrações de 50 µM de teofilina e foi notado que efeitos lipolíticos ocorrem em concentrações de derivados de xantinas que produzem inibições menores do que 20% da atividade da fosfodiesterase (Beavo *et al.*, 1970). Assim, alguma precaução é requerida quando se considerar que as metilxantinas exercem seus efeitos simplesmente como antagonistas do receptor da adenosina (Daly, 1982).

### 7.1.3 Cálcio

Os efeitos da cafeína nos movimentos do cálcio na célula foram primeiramente estudados em músculos esqueléticos. Em preparações *in vitro*, cafeína em altas concentrações produz uma contração sustentada dos músculos esqueléticos (Bianchi, 1968; Lüttgau & Oetliker, 1968). Este efeito resulta de um aumento da disponibilidade intracelular de cálcio, pois a cafeína inibe a recaptação de cálcio dependente de ATP para o retículo sarcoplasmático e o cálcio liberado se acumula (Weber & Herz, 1968; Su & Hasselbach, 1984; Chapman & Tunstall, 1988). Esta ação ocorre via ação em canais de cálcio no retículo sarcoplasmático (Pessah *et al.*, 1987). A inibição da recaptação e a liberação de  $Ca^{+2}$ , ocorrem em faixas de concentração de 1 a 25 mM. A cafeína parece produzir efeitos similares nos neurônios, assim a cafeína (5 a 15 mM) reduz a recaptação de cálcio em vesículas microssomais cerebrais (Trotta & Freire, 1980). Em neurônios intactos, a

cafeína (10mM) aumenta  $[Ca^{+2}]_i$ ; por causar a liberação deste cátion dos sítios intracelulares localizados nas células ganglionares da raiz dorsal (Neering & Mc Burney, 1984; Thayer *et al.*, 1988b) e em neurônios simpáticos (Lipscombe *et al.*, 1988).

O estoque de cálcio em neurônios que respondem à cafeína difere dos que respondem ao trifosfato de inositol e é susceptível ao bloqueio pela rianodina (Thayer *et al.*, 1988a,b; Martinez-Serrano & Satrustegui, 1989). Assim, está claro que a cafeína pode alterar a disponibilidade de cálcio no corpo celular e porções terminais de neurônios, mas não está claro em que extensão esta ação contribue para a farmacologia da cafeína após administração sistêmica em vista das doses requeridas para a produção destes efeitos.

#### **7.1.4 Outras interações farmacológicas das metilxantinas**

##### **7.1.4.1 Receptores benzodiazepínicos/receptores subtipo GABA<sub>A</sub>**

Certos efeitos centrais da cafeína são devidos a uma interação com os receptores benzodiazepínicos (Marangos *et al.*, 1979a). As metilxantinas inibem competitivamente a ligação dos benzodiazepínicos (Marangos *et al.*, 1979b; Boulenger *et al.*, 1982; Weir & Hruska, 1983) e aumentam o número de sítios de ligação dos benzodiazepínicos (Kaplan *et al.*, 1989). É sabido que a cafeína antagoniza vários efeitos centrais do diazepam (Polc *et al.*, 1981). Entretanto as doses de cafeína requeridas para inibir a ligação dos benzodiazepínicos são altas (0,1 a 2,0 mM), as concentrações que produzem 50% de inibição variam entre 400 a 800 $\mu$ M e algumas investigações não observaram alterações nesta ligação (Lopez *et al.*, 1989). Existe uma possibilidade de que o antagonismo observado seja devido a um efeito oposto, do ponto de vista fisiológico (Roache & Griffiths, 1987). Outras observações indicam que a cafeína pode interagir com o receptor GABA<sub>A</sub>, que é

acoplado ao canal de cloro. A cafeína diminui a entrada de cloro estimulada pelo muscimol (Lopez *et al.*, 1989), sugerindo um impedimento no acoplamento receptor-canal.

#### **7.1.4.2 Interação com a adrenalina**

A cafeína e a teofilina potencializam as respostas da noradrenalina no sistema vascular *in vitro* por inibir a recaptação extraneuronal e o metabolismo desta monoamina, pela catecol-O-metiltransferase (Kalsner, 1971; Kalsner *et al.*, 1975). Esta ação ocorre em concentrações de aproximadamente 150  $\mu\text{M}$  e pode contribuir para os efeitos das metilxantinas no sistema vascular.

#### **7.1.4.3 Metabólitos do ácido araquidônico**

A cafeína apresenta ações antiinflamatórias e em baixas doses potencia a ação antiinflamatória de vários inibidores da ciclooxigenase (Vinegar *et al.*, 1976; Seegers *et al.*, 1981). Entretanto a cafeína não inibe a síntese das prostaglandinas por si mesma, nem aumenta a inibição induzida pela aspirina (Vinegar *et al.*, 1976). Em coração isolado perfundido de rato, adenosina aumenta a produção de prostaciclina por um mecanismo sensível à metilxantina (Ciabattoni & Wennmalm, 1985; Karwatowska-Prokopczuc *et al.*, 1988). Entretanto, este pode não necessariamente refletir um acoplamento direto do receptor da adenosina com o sistema de transdução de sinal do ácido araquidônico, porque o aumento nos níveis de prostaciclina podem ser secundários às mudanças no fluxo sanguíneo induzido pela adenosina. Também a 3-isobutil-1-metilxantina, que como a cafeína, é um inibidor de fosfodiesterase (Smellie *et al.*, 1979; Davis, 1984) e antagonista do receptor da adenosina (Daly *et al.*, 1981), pode inibir diretamente a atividade da fosfolipase A e

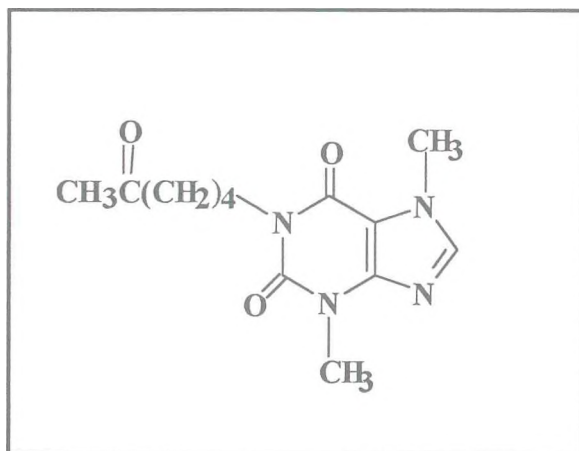
a liberação de ácido araquidônico, como também, a atividade da cicloxigenase em concentrações variando entre 0,5 a 1mM (Whorton *et al.*, 1985).

## 8. PENTOXIFILINA (Trental ®)

### 8.1 Descrição

A pentoxifilina é um derivado da xantina tri-substituído (Figura 7), designado quimicamente como 1-(5-oxohexil)-3, 7-dimetilxantina que diferente da teofilina, é um agente hemorreológico, isto é, um agente que afeta a viscosidade sanguínea. A pentoxifilina é solúvel em água e etanol e pouco solúvel em tolueno (Windholz & Budavari, 1983).

Figura 7. Estrutura química da Pentoxilina



### 8.2 Modo de ação

A pentoxifilina e seus metabólitos melhoram o fluxo sanguíneo por diminuir a viscosidade do sangue. Em pacientes com doença arterial periférica crônica, a droga aumenta o fluxo sanguíneo por afetar a microcirculação e aumentar a



oxigenação tecidual. O modo de ação preciso e a sequência de eventos que levam à esta melhora ainda estão por ser definidos.

A pentoxifilina inibe a agregação leucocitária e sua ativação, melhora a taxa de deformação eritrocitária e altera a curva de dissociação do oxigênio melhorando a liberação do oxigênio tecidual (Ward & Clissold, 1987).

Seu principal mecanismo de ação parece estar relacionado a uma melhora geral das características hemorreológicas, tais como a deformidade eritrocitária, a agregação plaquetária e a concentração plasmática de fibrinogênio (Muller, 1979, 1981; Schmid-Schönbein *et al.*, 1976; Hammerschmidt *et al.*, 1988). Também já está demonstrado que a droga intensifica a deformabilidade dos leucócitos, inibe a adesão dos neutrófilos e sua consequente ativação. A oxigenação tecidual é significativamente aumentada por doses terapêuticas de pentoxifilina em pacientes com doença arterial periférica.

### **8.3 Efeitos hemorreológicos da Pentoxifilina**

Várias propriedades hemorreológicas da pentoxifilina já foram demonstrados. Efeitos favoráveis na interação entre granulócitos, plaquetas, eritrócitos e endotélio contribuem para a passagem de sangue através da microcirculação e aumentam a oxigenação tecidual em áreas isquêmicas (Ehrly & Saeger-Lorenz, 1987). A pentoxifilina aumenta a deformabilidade (filtrabilidade) dos eritrócitos (Angelkort *et al.*, 1989; Ambrus *et al.*, 1990), neutrófilos (Weiss *et al.*, 1994) e monócitos (Dormandy *et al.*, 1989); diminui a agregação eritrocitária (Perego *et al.*, 1986) e plaquetária (Ambrus *et al.*, 1990; Muggeo *et al.*, 1983) e diminui o nível plasmático de fibrinogênio (Soria *et al.*, 1989). Além disso, a pentoxifilina diminui os efeitos da ativação neutrofilica, tais como, liberação de radicais superóxidos (Ciuffetti *et al.*, 1994), adesividade e agregação neutrofilica, liberação de elastase e os níveis de citocinas inflamatórias (Fossat *et al.*, 1995).

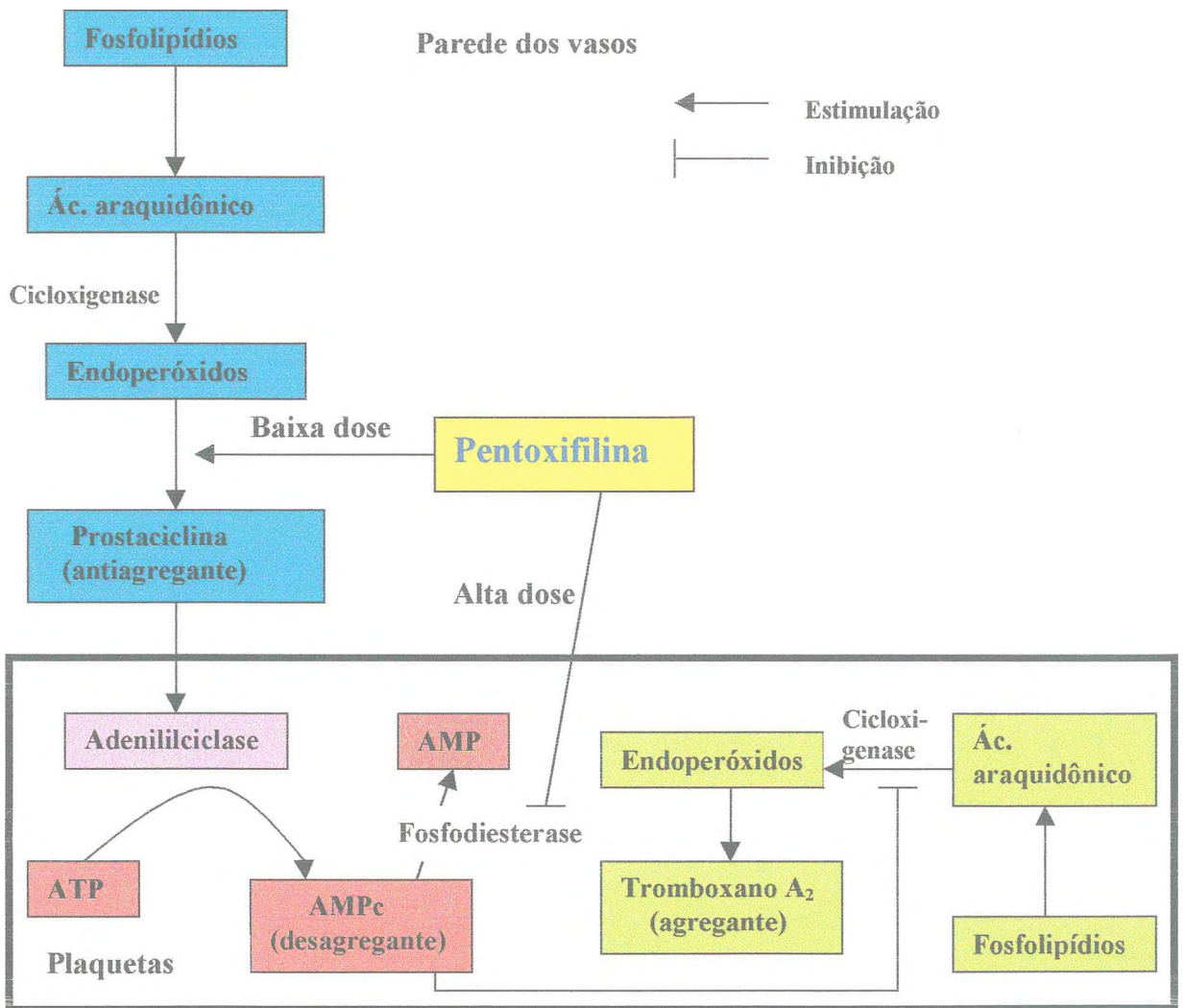
Outros estudos têm demonstrado que a pentoxifilina diminui a adesividade dos polimorfonucleares às células endoteliais (Hou *et al.*, 1995; Franzini *et al.*, 1995), aumenta a quimiotaxia (Mandell, 1995) inibe a síntese de TNF- $\alpha$  (Bernard *et al.*, 1995) e a produção de interleucina-1 pelos monócitos e macrófagos em resposta à inflamação (Mandell, 1995). Os efeitos da droga nos eritrócitos e neutrófilos são atribuídos, pelo menos em parte, à inibição da fosfodiesterase e consequentemente ao aumento do AMPc (Samlaska & Winfield, 1994), que desempenha papel importante no controle da ativação e proliferação de monócitos/macrófagos e linfócitos T e B (Bienvenu *et al.*, 1995) e na redução da agregação plaquetária, formação de radicais de oxigênio e formação de TNF- $\alpha$  (Endres *et al.*, 1991).

Foi também demonstrado que a pentoxifilina influencia os níveis de nucleotídeos cíclicos. *In vitro*, a adição de pentoxifilina aumenta os níveis de ATP nas hemácias de pacientes com arteriosclerose (Porsche & Stefanovich, 1978), outros autores observaram um aumento nos níveis de GMPc (Fjodorov *et al.*, 1978). Também foi demonstrado uma inibição da fosforilação da proteína quinase AMPc-independente, mas não da AMPc-dependente (Lecomte & Boivin, 1981).

Além disso, a pentoxifilina não tem efeito nos movimentos de cálcio, Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATPase, influxo de sódio, permeabilidade do potássio cálcio-sensível, trocas de cloro ou permeabilidade à glicose em hemácias (Giraud & Claret, 1981; Johnsson, 1979; Motais, 1981). A administração oral e parenteral de pentoxifilina em pacientes com doença vascular periférica levou a um decréscimo nos níveis de fibrinogênio (Di Perri *et al.*, 1984). Estudos em plaquetas humanas e bovinas mostraram que a pentoxifilina aumenta os níveis de AMPc e inibe a fosfodiesterase ligada à membrana. Esta mudança ativa uma proteína quinase que catalisa a fosforilação de proteínas de membrana pelo ATP, resultando em inibição da agregação plaquetária (Stefanovich, 1978). Além disso, estudos *ex vivo* em humanos demonstraram redução na agregação plaquetária induzida por ADP, serotonina e

adrenalina (Poggesi *et al.*, 1985; Pilla *et al.*, 1983). Pentoxifilina também apresentou um efeito estimulatório da síntese e liberação de prostaciclina e efeito redutor na síntese de tromboxano (Poggesi *et al.*, 1985) (Figura 8).

**Figura 8. Ação da pentoxifilina na síntese de prostaciclina e tromboxano**



## 8.4 Efeitos cardiovasculares

A pentoxifilina produziu uma redução dose-dependente na pressão sanguínea e uma taquicardia moderada, quando administrada intravenosamente em cães anestesiados e relaxamento do músculo liso por aumentar os níveis de AMPc (Kamphuis *et al.*, 1994). A administração intra-arterial produziu efeitos cronotrópicos e inotrópicos positivos (Watanabe *et al.*, 1982), enquanto a administração intravenosa de pentoxifilina 3, 6 ou 9 mg/kg em cães acordados, não produziu efeitos hemodinâmicos (Schreiber *et al.*, 1983). Efeitos benéficos da pentoxifilina foram observado por Kobaladze e Gibradze (1979) em modelo de isquemia miocárdica em cães. A administração oral de pentoxifilina melhorou o fluxo sanguíneo nos membros inferiores de pacientes com doença arterial obstrutiva periférica (Di Pierri *et al.*, 1984) incluindo aqueles com aterosclerose diabética (Schweiger & Ortmeier, 1989).

## 8.5 Efeitos da Pentoxifilina no SNC

Já está demonstrado que a hiperviscosidade sanguínea, a redução da deformidade eritrocitária, o aumento da agregabilidade plaquetária e nos níveis de fibrinogênio, podem ser correlacionados com doenças cerebrovasculares (Fukuda *et al.*, 1978; Müller & Lahrach, 1981). Tanto a administração intravenosa de pentoxifilina (400 mg), quanto o tratamento oral (1200 mg/d) resultaram em um aumento no fluxo sanguíneo cerebral, medido pelo clearance de Xe<sup>133</sup>, em pacientes com doença cerebrovascular crônica (Passero *et al.*, 1981; Hartmann, 1983). Em experimentos de isquemia produzida em cães, a pentoxifilina aumentou o fluxo sanguíneo cerebral em regiões isquêmicas, sem causar vasodilatação significativa (Tanaka *et al.*, 1980).

Estudo do efeito da pentoxifilina no metabolismo cerebral em cobaias mostrou um aumento no consumo de oxigênio e utilização de glicose (Cohen *et al.*, 1979). Em ratos normais e anóxicos, a pentoxifilina aumentou as concentrações de adenina nucleotídio (Porsche & Stefanovich, 1979) e inibiu os níveis de fosfodiesterase dependente de AMPc (Havashi & Ozawa, 1974). Em cobaias com isquemia cerebral produzida por oclusão da carótida, o tratamento oral com pentoxifilina preveniu alterações na concentração de ATP e fosfocreatina e um decréscimo na mortalidade de ratos (Bluhm *et al.*, 1985). Estudo de ultraestrutura em fatias de córtex cerebral de cobaias com isquemia cerebral demonstrou um aumento significativo no tamanho das mitocôndrias dos neurônios após tratamento com pentoxifilina. Foi também observado um aumento no consumo de oxigênio e na utilização de glicose (Hartmann *et al.*, 1977). No mesmo estudo a pentoxifilina normalizou o balanço de sódio, potássio e água, provavelmente devido a estabilização da função da membrana celular, do tecido cerebral (Micic *et al.*, 1981).

A administração intraperitoneal de pentoxifilina em ratos diminuiu o número de sítios de receptores  $\alpha$ - e  $\beta$ -adrenérgicos no córtex cerebral e de  $\beta$ -adrenérgicos no hipotálamo e glândula pineal, sugerindo que a droga pode causar depressão adrenérgica aguda no cérebro (Lowenstein *et al.*, 1982). Também foi observado um aumento nos níveis de aminas neurotransmissoras no SNC, possivelmente causado pela facilitação do transporte de 5-hidroxitriptófano nos neurônios (Kitatani *et al.*, 1985) ou pelo aumento da taxa de hidroxilação do triptofano e tirosina, *turnover* de noradrenalina e liberação de dopamina (Cardinali, 1978) produzidos pela droga.

## 8.6 Efeitos gerais

Diferente de outras metilxantinas, experimentos *in vivo* usando gatos e roedores revelaram que a pentoxifilina tem poucos efeitos no sistema nervoso central e autonômico, músculo liso não vascular ou trato urinário (Sakaguchi &

Hayashi, 1978). Entretanto, o broncoespasmo induzido em animais, foi inibido pela pentoxifilina (Boksay & Bollmann, 1971) e em homens, a injeção intravenosa de pentoxifilina mostrou efeitos broncoespasmolíticos em pacientes com bronquite obstrutiva crônica (Nolte, 1971).

Já está demonstrado que as metilxantinas (teofilina e pentoxifilina) induzem mudanças hemodinâmicas em nefropatias associadas a drogas (Heidemann *et al.*, 1983, 1989). Estes compostos são antagonistas dos receptores da adenosina e melhoram a função renal na insuficiência renal aguda induzida por glicerol, cloreto de mercúrio, cisplatina, anfotericina B e ciclosporina (Brunner *et al.*, 1989; Vadiiei *et al.*, 1989; Luke *et al.*, 1989; Wasan *et al.*, 1990). Os efeitos diuréticos e vasodilatadores da teofilina podem explicar, em parte, a melhora da insuficiência renal aguda (Bakris & Burnett 1985; Bidiani *et al.*, 1987; Rob *et al.*, 1989; Hendeles & Weinberger 1983). Estes achados sugerem que a pentoxifilina pode ser um descongestionante vascular após episódios isquêmicos.

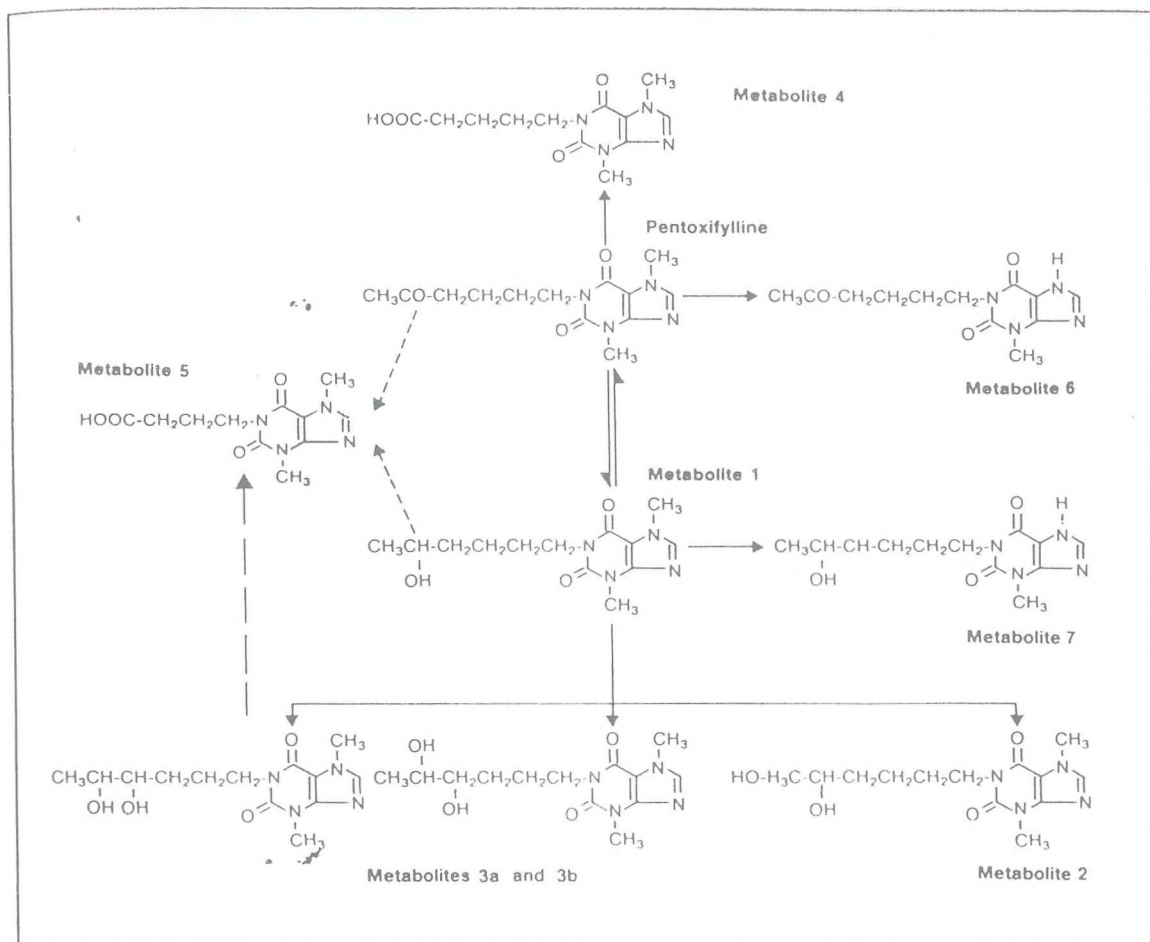
A pentoxifilina tem sido usada no tratamento da claudicação intermitente (Rao *et al.*, 1990; Thomson *et al.*, 1990). Compostos deste tipo, ganharam interesse como modulador da inflamação (Tuckey *et al.*, 1992). Vários autores têm demonstrado que a pentoxifilina protege animais de exposição letal a lipopolissacarídeos (Schonharting & Schade, 1989; Fechter *et al.*, 1992), melhora a sobrevivência de camundongos com malária cerebral (Kremsner *et al.*, 1991) e protege os pulmões contra a injúria durante sepsis (Ishizaka *et al.*, 1988). Além disso já está demonstrado que a pentoxifilina inibe a expressão do RNA mensageiro do fator de necrose tumoral- alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina-1 $\beta$  (Strieter *et al.*, 1988) e de uma maneira dose-dependente reduz a produção de TNF- $\beta$  e TNF- $\beta$  RNAm por células mononucleares estimuladas por LPS (Rieneck *et al.*, 1993). Foi também demonstrado (Kiumars *et al.*, (1996), que a pentoxifilina inibe a liberação de óxido nítrico de células renais induzidas por LPS e reduz a citotoxicidade.

## 8.7 Farmacocinética

Após a administração oral de uma solução aquosa, a pentoxifilina é quase totalmente absorvida. Ela sofre o efeito de primeira passagem pelo fígado e vários de seus metabólitos aparecem no plasma muito rapidamente. Em seres humanos, a pentoxifilina é primeiramente metabolizada por redução (possivelmente por aldeto redutase) para formar metabólitos farmacologicamente ativos- metabólito I e por oxidação para formar outros metabólitos especialmente 4 e 5 (Figura 9). O pico plasmático do composto e de seus metabólitos são alcançados dentro de 1 hora. Do ponto de vista quantitativo, os metabólitos mais importantes são, Metabólito I- 1-[5-hidroxi-hexil]-3,7-dimetilxantina e Metabólito V- 1-[3-carboxipropil]-3,7-dimetilxantina e os níveis plasmáticos destes metabólitos são 5 a 8 vezes maiores, respectivamente, que os níveis de pentoxifilina (Beermann *et al.*, 1985; Ward & Clissold, 1987).

Após a administração oral de soluções contendo 100 a 400 mg de pentoxifilina, a farmacocinética do composto e do Metabólito I são dose-relacionadas e não proporcional (não linear), com meia vida e área sob a curva (AUC) aumentando com a dose. A cinética de eliminação do Metabólito V não é dose-dependente. A aparente meia vida plasmática da pentoxifilina varia de 0,4 a 0,8 horas e a de seus metabólitos de 1 a 1,6 horas (Beermann *et al.*, 1985; Smith *et al.*, 1986). Não existe evidência de acumulação ou indução enzimática (citocromo p450) após múltiplas doses. A excreção é quase totalmente urinária, o principal produto é o Metabólito V. De um modo geral, não se encontra a pentoxifilina na urina. Menos de 4% é encontrada nas fezes. A administração de alimentos atrasa a absorção de uma formulação de liberação imediata, mas não afeta a absorção total ( Wills *et al.*,

Figura 9. Farmacocinética da Pentoxifilina



1981). Foi demonstrado que indivíduos com insuficiência renal têm um decréscimo no clearance de pentoxifilina (Schaefer *et al.*, 1979) e a taxa de eliminação diminui em pacientes idosos (60-68 anos) comparados com jovens (22-30 anos). Após a administração de uma formulação de liberação prolongada de 400 mg, os níveis plasmáticos do composto e de seus metabólitos alcançam seu máximo dentro de 2 a 4 horas e permanecem constantes por um grande período de tempo. Um volume de distribuição de 168 L foi calculado para a pentoxifilina após a administração intravenosa, em voluntários saudáveis. Em ratos e cães, a concentração de pentoxifilina foi igual no cérebro, coração, fígado, pulmões, rins e músculos



esqueléticos, mostrando distribuição e tempo de administração similares (Sakaguchi & Hayashi, 1978). Como outras metilxantinas, a pentoxifilina é encontrada no leite materno, 2 horas após a sua administração (Witter & Smith, 1985).

## 8.8 Indicações e usos

A pentoxifilina é indicada para o tratamento de pacientes com claudicação intermitente com base na doença oclusiva arterial crônica das extremidades (Porter *et al.*, 1982; Reich & Gillings, 1987; Lindgarde *et al.*, 1989; Rao *et al.*, 1990; Thomson *et al.*, 1990). A pentoxifilina pode melhorar a função e os sintomas mas não substitue a terapia definitiva, tal como, cirurgia de *bypass* ou a remoção da obstrução arterial quando se trata de uma doença vascular periférica.

Vários estudos piloto foram realizados utilizando a pentoxifilina no tratamento da isquemia. Farrajota e cols. (1989), estudando 22 pacientes diabéticos mostraram que a pentoxifilina melhora os sintomas de isquemia em 82% dos pacientes no estágio III e 20% dos pacientes no estágio IV (classificação de Fontaine) e uma melhora na dor destes pacientes na primeira semana de tratamento. Outro estudo feito por Antignani e cols. (1987), mostrou que pacientes com doença vascular periférica que foram submetidos a um tratamento com pentoxifilina (800 mg via oral e 300 mg por via intravenosa, 2 vezes ao dia), apresentaram diminuição na intensidade da dor em 78% dos pacientes no estágio III e melhora das lesões tróficas em 47% dos pacientes no estágio IV. No estudo feito por Harwart (1979), uma grande variedade de sintomas de origem cerebral e periférica, tais como, dor de cabeça, insônia, perda de memória, fadiga, vertigem, parestesia, claudicação, ulceração, foram atenuados em pacientes com desordens cerebrovascular crônica que foram tratados com pentoxifilina (1200 mg/d). A eficácia da pentoxifilina na tratamento da demência vascular foi investigada em um estudo duplo-cego, que

mostrou uma mais lenta progressão da demência em pacientes que tomaram a droga por via oral (Black *et al.*, 1992; Folnegovic-Smalc *et al.*, 1993).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia da pentoxifilina no tratamento de úlcera das pernas (Bossong, 1972; Weitgasser, 1983; Herger, 1986; Barbarino, 1992). Também foi demonstrado eficácia na prevenção de reoclusão após cirurgia vascular (Lucas, 1984; Raithel & Kasparzak, 1985). Em dois estudos envolvendo 11 e 25 pacientes diabéticos, respectivamente, com dano na função renal (e retinopatia em 19 pacientes), a administração intravenosa e/ou oral (média de 600 mg/dia) por 3 a 8 semanas, foi associada com melhora na função renal e redução na agregação plaquetária e hipercoagulabilidade (Specivzeva *et al.*, 1980; Blagosklonnya *et al.*, 1982). Em outros estudos, o uso de pentoxifilina foi associado com a melhora nas funções hemorreológicas e de coagulação em pacientes portadores de retinopatia diabética (Gincherman *et al.*, 1982; Goltseva, 1983; Saldan, 1984). A pentoxifilina demonstrou ter efeitos benéficos no tratamento de desordens vasculares miocárdicas (Manrique, 1983; Biamino, 1986).

Alguns estudos em pacientes com astenozoospermia, a pentoxifilina aumentou a concentração e a motilidade dos espermatozóides (Aparicio *et al.*, 1980; Marrama *et al.*, 1985).

## 8.9 Contra-indicações

A pentoxifilina não deve ser usada em pacientes com hemorragia cerebral e/ou retinal recente ou em pacientes com intolerância a este produto ou a outras metilxantinas tais como cafeína, teofilina e teobromina.

Pacientes com doença oclusiva arterial crônica dos membros, frequentemente mostram outras manifestações de doença arteriosclerótica. A pentoxifilina pode ser usada com relativa segurança no tratamento de doença arterial periférica em pacientes com doença arterial coronariana e doença cerebrovascular, mas existem

alguns casos relatados de angina, hipotensão e arritmia após o uso da droga (Katsunuma *et al.*, 1982). Estudos controlados não mostram que a pentoxifilina causa estes efeitos adversos mais frequentemente que o grupo placebo, mas como ele é um derivado da metilxantina, é possível que alguns indivíduos demonstrem tais respostas. Pacientes em uso de warfarina devem ser mais frequentemente monitorado quanto ao tempo de protrombina, enquanto pacientes com outros fatores de risco complicados por hemorragia (ex. recente cirurgia, úlcera péptica, sangramento cerebral e/ou retinal) devem ser examinados periodicamente no que se refere a sangramentos, além das determinações de hematócrito e/ou hemoglobina (Inglerslev *et al.*, 1986).

### **8.10 Interações com outras drogas**

Embora uma relação causal não tenha sido estabelecida, existem relatos de sangramentos e/ou prolongamento do tempo de protrombina em pacientes tratados com pentoxifilina com e sem anticoagulantes ou inibidores de agregação plaquetária (Inglerslev *et al.*, 1986). A pentoxifilina pode ser usada com outras drogas tais como, antihipertensivas, beta-bloqueadores, digitálicos, diuréticos, antidiabéticos e antiarrítmicos, sem problemas, mas como já foram registradas quedas na pressão sanguínea recomenda-se que a dosagem de antihipertensivos deva ser reduzida (Angelkort *et al.*, 1982; Solerte *et al.*, 1986).

### **8.11 Carcinogênese, mutagênese e interferência na fertilidade**

Estudos crônicos do potencial carcinogênico da pentoxifilina foram feitos em ratos e camundongos, tendo sido a droga administrada em doses acima de 450 mg/Kg (aproximadamente 19 vezes a dose máxima diária recomendada para humanos). Em camundongos a pentoxifilina foi administrada durante 18 meses, enquanto que, em ratos foi administrada por 18 meses, seguidos de 6 meses sem administração. No estudo em ratos, houve um aumento significativo na incidência

de fibroadenomas mamários benignos em fêmeas. A relevância desse achado para humanos é incerta. A droga não demonstrou atividade mutagênica em várias cepas de *Salmonella* e em cultura de células mamárias quando testada na ausência e na presença de ativação metabólica

Estudos de teratogenicidade em ratos e coelhos, usando doses de 576 e 264 mg/kg, respectivamente, mostraram que não houve evidência de malformação fetal, contudo, um aumento na reabsorção fetal foi observado nas doses de 576 mg/kg. Não existem estudos adequados e bem controlados em mulheres grávidas. Assim, a droga só deve ser usada durante a gravidez se o potencial benéfico justificar os riscos para o feto. A pentoxifilina e seus metabólitos são excretados no leite (Witter & Smith, 1985), portanto, devido ao potencial tumorigênico para ratos, deve-se evitar amamentar e descontinuar o uso durante este período. A segurança e a efetividade da pentoxifilina em crianças não foram bem estabelecidas.

### **8.12 Reações adversas**

Estudos clínicos usando tabletes de pentoxifilina de liberação prolongada, por mais de 60 semanas (2 a 3 vezes ao dia) e cápsulas de liberação imediata (três vezes ao dia) por mais de 24 semanas, mostrou que a incidência de reações adversas foi mais alta com as cápsulas, com efeitos no trato gastrointestinal (náusea, desconforto abdominal, vômito, flatulência, dispepsia) e efeitos no sistema nervoso central (tontura, dor de cabeça, insônia e visão turva) (Katsunuma *et al.*, 1982). Além dos sintomas acima foram relatados com menor frequência (< 1%): dispnea, hipotensão, edema, anorexia, constipação, boca seca, ansiedade, depressão, confusão mental, convulsão, epistaxe, congestão nasal, prurido, urticária e conjuntivite (Ward & Clissold, 1987; McEvory, 1995).

## 9. Relevância e Justificativa

Grande número de dados da literatura mostram que o glutamato *in vivo* e *in vitro* pode ser tóxico para neurônios de várias regiões cerebrais. Consequentemente, o glutamato tem sido objeto de grande número de pesquisas que focalizam a base excitotóxica das doenças neurodegenerativas, sendo muito importante a busca de estratégias terapêuticas que venham a minimizar ou impedir o dano neuronal. Assim, resolvemos usar um modelo de lesão hipocampal com glutamato, tentando imitar os danos celulares e cognitivos ocorridos durante uma grande liberação de glutamato, como ocorre durante um episódio isquêmico, por exemplo. Sendo de nosso interesse investigar a participação dos radicais livres no processo citotóxico. Para a avaliação dos danos cognitivos escolhemos os modelos de memória aversiva e espacial que comprovadamente necessitam das vias hipocampais íntegras para serem formadas ou consolidadas. Como possível droga protetora, escolhemos usar a pentoxifilina, uma metilxantina, usada atualmente no tratamento de doenças vasculares periféricas, que tem um espectro muito amplo de ações, tais como, hemorreológica, inibidora de TNF- $\alpha$ , antagonista do receptor da adenosina e inibidora de fosfodiesterase, dentre outras. Assim, é esperado que a pentoxifilina por suas propriedades antiinflamatórias e inibidora da produção de citocinas, venha a minimizar o dano celular induzido pelo glutamato, bem como, por aumentar os níveis de nucleotídeos cíclicos, que como já se sabe, está envolvido na formação da memória, tenha um efeito de melhorar os danos cognitivos acarretados pela lesão. Além disso, a participação dos receptores da adenosina e colinérgicos muscarínicos na ação da pentoxifilina também será investigada.

## ***II - ΟΒΓΕΤΩΝΟΣ***

---

## II- OBJETIVOS

---

### GERAL

Estudar os efeitos da administração sistêmica de pentoxifilina, uma metilxantina, no aprendizado e memória, e seu mecanismo de ação, utilizando um modelo de excitotoxicidade com glutamato em hipocampo de rato.

### ESPECÍFICOS

1. Estudar os efeitos da lesão hipocampal com glutamato na atividade locomotora e na memória, usando os modelos de Esquiva passiva, Labirinto em T elevado e Labirinto aquático;
2. Estudar os efeitos da pentoxifilina (1-(5-oxohexil)-3,7-dimetilxantina), na atividade locomotora e na memória, após lesão hipocampal com glutamato, usando os modelos de Esquiva passiva, Labirinto em T elevado e Labirinto aquático;
3. Determinar a concentração de AMP<sub>c</sub>, após tratamento com pentoxifilina, no modelo de lesão hipocampal com glutamato;
4. Determinar a densidade dos receptores muscarínicos (M1+M2), em hipocampo, após tratamento com pentoxifilina, no modelo de lesão hipocampal com glutamato;
5. Determinar o nível de peroxidação lipídica, através da dosagem de malondialdeído em hipocampo, após tratamento dos animais, com pentoxifilina, no modelo de lesão hipocampal com glutamato;

6. Determinar a formação de óxido nítrico, através da dosagem de nitrito/nitrato, em hipocampo, após tratamento com pentoxifilina, no modelo de lesão hipocampal com glutamato;
7. Estudar a participação colinérgica central da pentoxifilina no modelo de tremores induzidos pela oxotremorina;
8. Determinar a ação da pentoxifilina na atividade acetilcolinesterásica;
9. Estudar a participação da adenosina nos efeitos da pentoxifilina, usando ciclopentiladenosina, um agonista do receptor da adenosina;
10. Estudar a participação do TNF- $\alpha$  nos efeitos da pentoxifilina, usando a talidomida, um inibidor da síntese de TNF- $\alpha$ .



### *III- ΜΑΤΕΡΙΑΣ Ε ΜΕΤΟΔΟΣ*

---

### III- MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 1. ANIMAIS

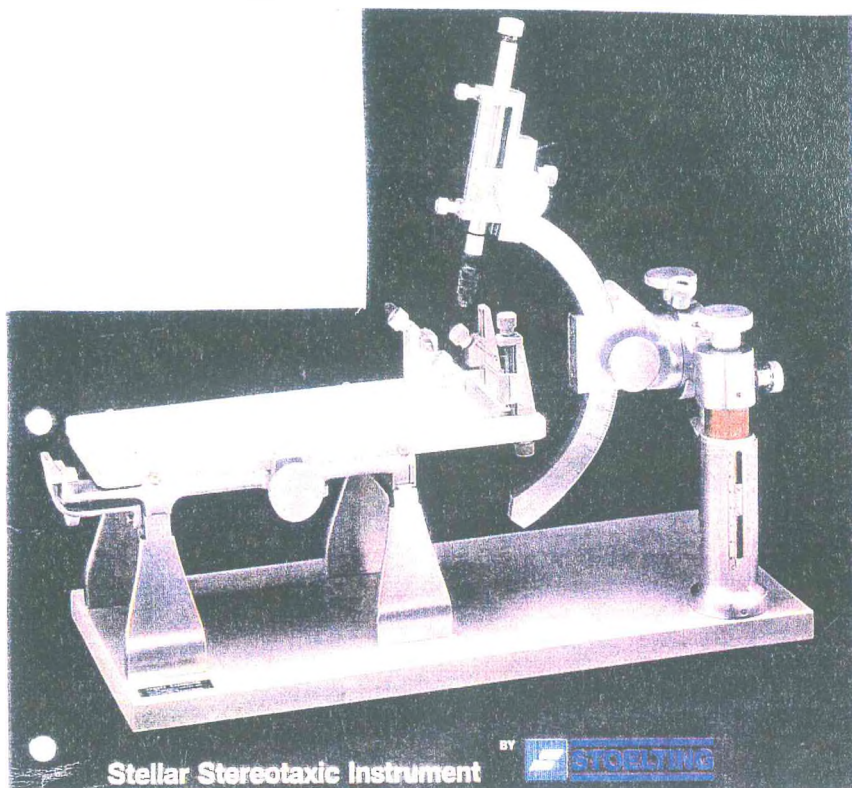
Foram utilizados, aproximadamente 400 ratos Wistar, machos, jovens (3 meses, 200-250g) e camundongos Swiss (aprox. 70 animais), machos (20g) provenientes do Biotério Central da UFC, mantidos à temperatura de 25° C com um ciclo de 12 h de luz/escuro e com livre acesso a água e comida.

#### 2. CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com tiopental sódico (30 mg/kg) e hidrato de cloral (150 mg/kg) administrados por via intraperitoneal e colocados em aparelho estereotáxico (Stoelting Co, USA) (figura 10 e 11). Seis orifícios foram abertos em cada hemisfério cerebral com uma broca dentária nº 35, por onde foi injetado com uma agulha Hamilton, 0,2 µL de uma solução de glutamato (conc. variando de 10 a 80 µg/µl) em cada região (em um volume final de 2,4 µL, de acordo com as seguintes coordenadas do Bregma (Paxinos & Watson, 1986) abaixo indicadas na região hipocampal (Figura 12):

Coordenadas	AP	L	L	V
Região				
CA <sub>3</sub>	-2,7	2,0	-2,0	4,4
	-4,2	3,2	-3,2	4,7
	-5,8	4,5	-4,5	3,8
CA <sub>1</sub>	-3,0	1,0	-1,0	3,5
	-4,5	2,8	-2,8	3,6
	-5,8	4,5	-4,5	5,0

**Figura 10- Aparelho estereotáxico**



**Figura 11- Animal posicionado no aparelho estereotáxico**

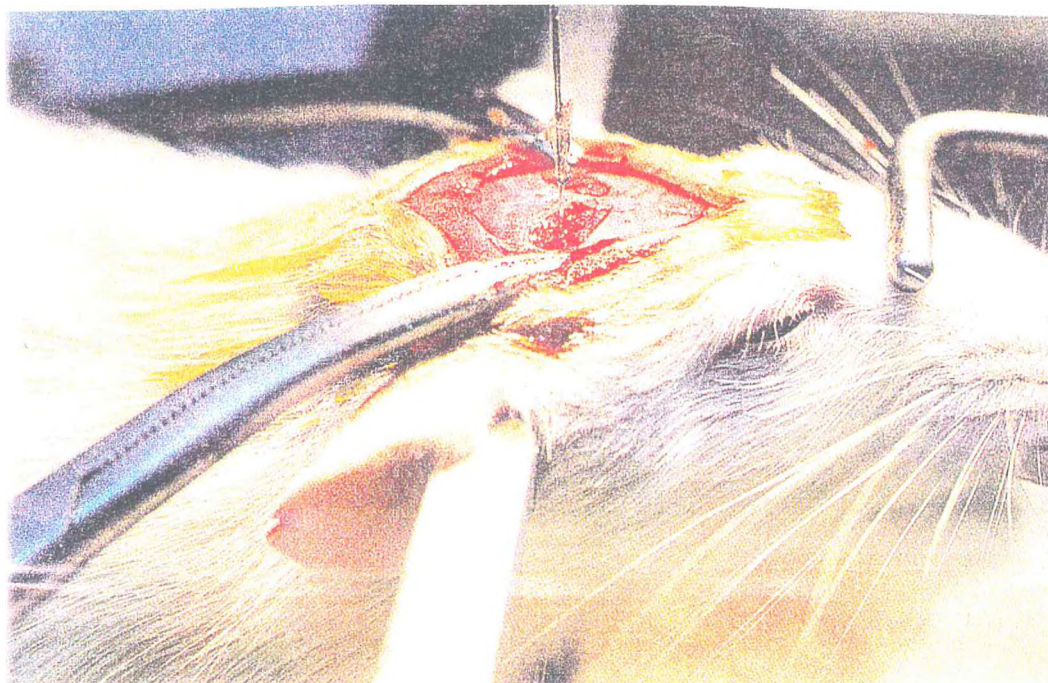
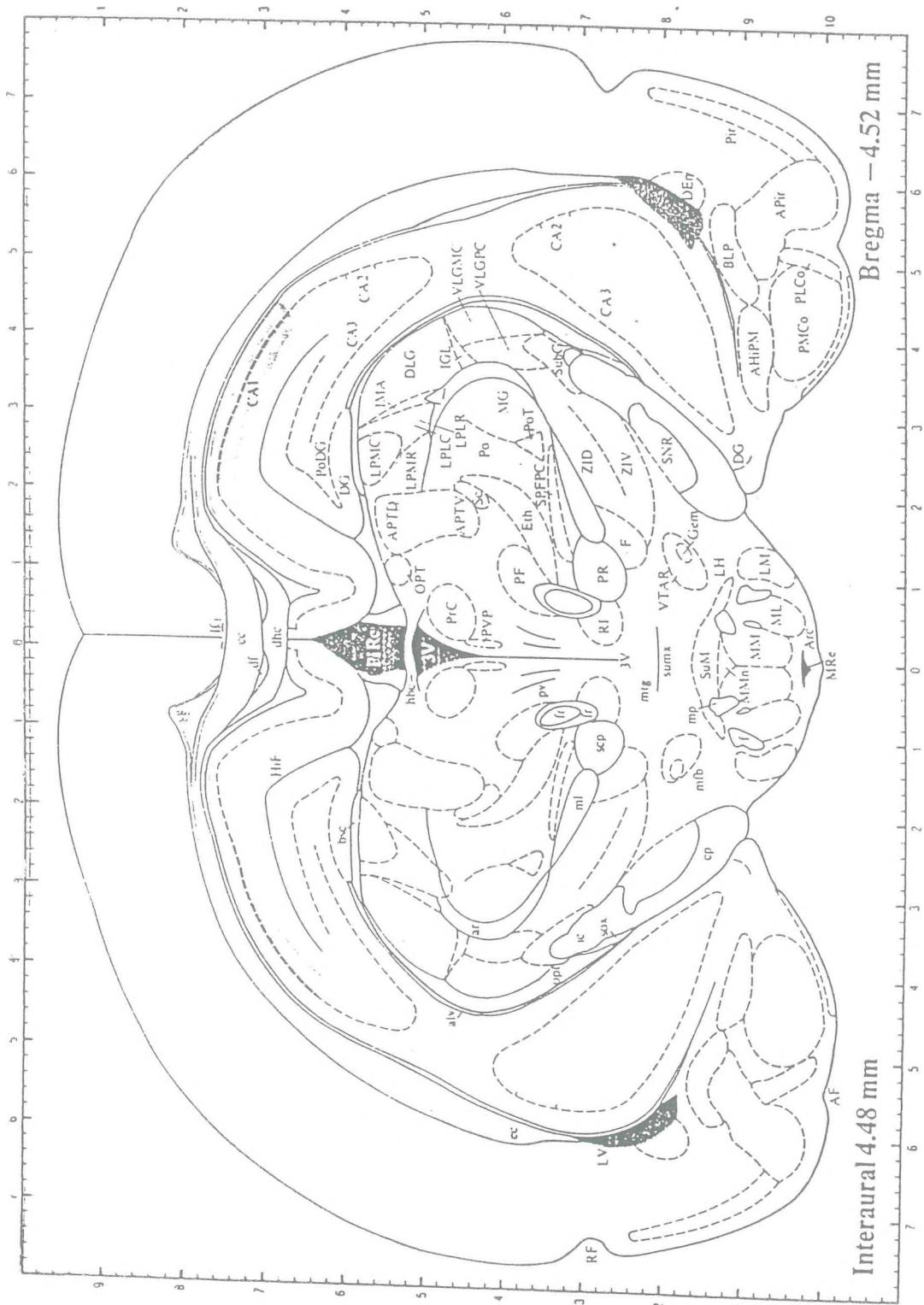


Figura 12- Área hipocampal a ser lesada



### 3. DROGAS USADAS NOS TRATAMENTOS

- Ácido l-glutâmico (Sigma-USA)- 10 a 80  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
- Pentoxifilina (Trental-Hoescht, Brasil)-20 mg/mL ampolas
- Tiopental sódico (CEME-Brasil)- 30mg/mL
- Hidrato de cloral (Sigma-USA)-150mg/mL
- Ciclopentiladenosina (Sigma-USA)- 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
- Talidomida (CEME-Brasil)- 20mg/mL
- Oxotremorina (Sigma-USA)- 0,06mg/mL
- Sulfato de atropina (Sigma-USA)

Todas as drogas foram dissolvidas em salina. Os reagentes usados no preparo dos tampões e demais soluções eram de grau analítico.

#### 4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Grupos	Tratamento
1	Não operado
2	Controle (salina, i.h.)
3	Glutamato (24, 48, 96 e 192 µg/rato), i.h.
4	Pentoxifilina (50, 100 e 200 mg/kg), i.p., 6 dias + Glutamato 96µg/rato, i.h. *
5	Pentoxifilina 100 mg/kg, i.p. + Glutamato 96µg/rato, i.h. *
6	Pentoxifilina 100 mg/kg, i.p., 6 dias + salina, i.h. *
7	CPA 100 µg/kg, i.p. + Pentoxifilina 100 mg/kg, i.p. + Glutamato 96µg/rato, i.h. *, **
8	CPA 100 µg/kg, i.p. + Glutamato (96µg/rato), i.h. *, **
9	CPA 100 µg/kg, i.p. + salina, i.h. *, **
10	Talidomida 10 mg/kg, i.p. + Pentoxifilina 100 mg/kg, i.p. + Glutamato 96µg/rato, i.h. *, **
11	Talidomida 10 mg/kg, i.p. + Glutamato 96µg/rato), i.h. *, **
12	Talidomida 10 mg/kg, i.p. + salina, i.h. *, **

i.p.- intraperitoneal; i.h.- intrahipocampal por estereotaxia

\* - O tratamento com a pentoxifilina foi iniciado 15 minutos antes da cirurgia estereotáxica

\*\* - O tratamento com CPA ou talidomida foi feito 15 minutos antes da injeção de pentoxifilina.

Ao final do tratamento todos os animais foram submetidos aos testes de atividade locomotora e memória. A seguir, foram sacrificados e o hipocampo foi dissecado sobre gelo, para estudos de *binding*, dosagem de AMPc, MDA e nitrito/nitrato. De cada grupo 3-5 animais foram selecionados ao acaso para estudo histopatológico.

Em outro grupo de experimentos (não constando no protocolo experimental) foram feitos estudos de determinação da densidade dos receptores M1+M2, determinação da atividade da acetilcolinesterase e tremores induzidos pela oxotremorina com os animais tratados com pentoxifilina mas não lesados com glutamato.

## 5. ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Os cérebros usados para a análise histopatológica, foram fixados com formol neutro a 10% durante 3 dias. Após um corte coronal inicial (1mm) ao nível do nervo óptico, foram obtidos fatias sequenciais nas direções antero-posterior e estas foram montados em parafina. Cortes histológicos de 8-10 $\mu$  foram então corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina. As lâminas foram examinadas em microscópio binocular Nikon e fotografadas.

A análise histopatológica (semi-quantitativa), foi feita por um caminho “simples cego” e as estruturas foram observados segundo o atlas de Paxinos & Watson, 1986. O grau de dano cerebral foi baseado na presença de gliose, picnose e vacuolização. A gravidade da lesão foi definida baseado numa escala percentual de 0 (ausência de lesão) à 100% (lesão severa) dentro de cada estrutura examinada por microscopia ótica (100x) e previamente definida para análise morfológica (Peredery *et al.*, 1992; Bureau *et al.*, 1994). Os resultados foram expressos como: 0 ou ausente- não existiu dano da estrutura; leve ou 25%- mais que 25 e menos que 50% da estrutura afetada; moderada ou 50%- mais que 50 e menos que 75% da estrutura afetada; grave- mais que 75% da estrutura afetada. Foram analisadas, em média, 3 lâminas por cada animal.

## 5.1 MÉTODO DE COLORAÇÃO PELA HEMATOXILINA- EOSINA

Cortes: Parafina, 8  $\mu$ m

Soluções:

Hematoxilina de Harris

- Hematoxilina- 7g
- Álcool absoluto- 50ml
- Alumen de potássio- 100g
- Água destilada- 1000ml
- Óxido amarelo de mercúrio- 2,5g

Solução de Eosina a 10%

### **Método:**

As lâminas foram desparafinizadas com xilol por 10 min, desidratadas em álcool absoluto (3 banhos) e lavadas com água corrente. Em seguida, foram cobertas com solução de Hematoxilina por 10 minutos, lavadas com água corrente e deixadas na água por 10 minutos. As lâminas foram então cobertas com solução de eosina (rapidamente) e lavadas com água corrente. Depois foram desidratadas com 3 banhos de álcool absoluto, banhadas em xilol (3 banhos) e montadas em Bálsamo do Canadá.



## 6. TESTES COMPORTAMENTAIS

### 6.1 TESTE DE ATIVIDADE LOCOMOTORA

Para verificar se o tratamento não acarretou alteração da atividade locomotora, o que prejudicaria a realização dos testes de memória, foi feito o teste de atividade locomotora usando o modelo do Campo Aberto (*Open Field*) (Broadhurst, 1957). O teste foi realizado vinte e quatro horas após o fim do tratamento com pentoxifilina, antes do início do teste do labirinto aquático.

O campo aberto consiste de uma arena circular de madeira branca (150 cm de diâmetro), com paredes brancas (30cm de altura). O piso da arena é dividido em 19 quadrantes aproximadamente iguais (Figura 13). No teste o animal foi colocado no centro da arena e deixado para explorar o ambiente por um (01) minuto. Após este período foi medido o número de quadrantes atravessados pelo animal, durante um tempo de três (03) minutos. A arena foi limpa com álcool a 20%, após a retirada de cada animal, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste.

### 6.2 TESTES DE MEMÓRIA

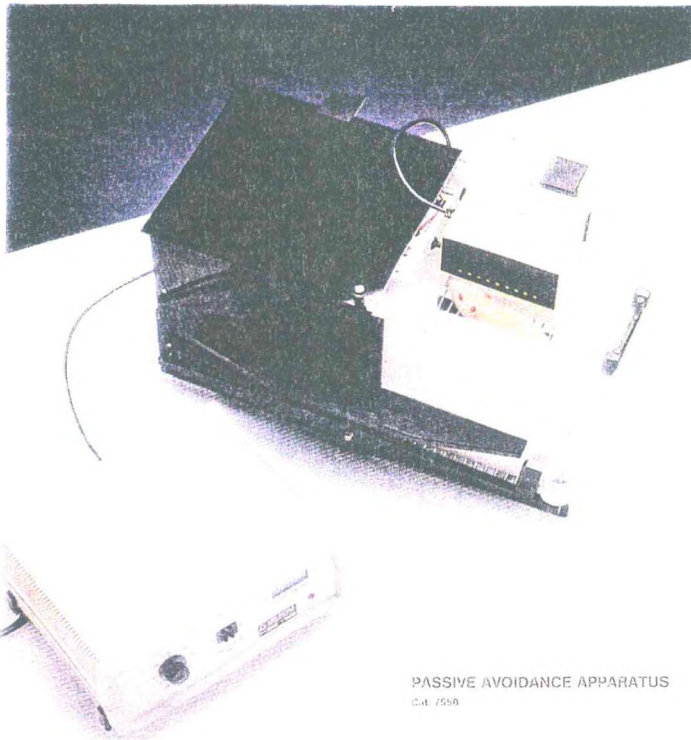
#### 6.2.1 ESQUIVA PASSIVA (*PASSIVE AVOIDANCE TEST*)

Este teste foi baseado no método de DeNoble e cols. (1986). Após a cirurgia estereotáxica e setenta e duas horas após tratamento com as drogas, os animais foram habituados ao aparelho de esquiva passiva. O aparelho consiste de uma caixa de acrílico (48 x 22 x 22), dividida em dois compartimentos separados por uma janela, um branco (iluminado) e um preto (escuro), este com o piso eletrificado (Figura 14). O animal foi colocado no compartimento iluminado e deixado para explorar livremente o aparelho, durante um (01) minuto, quando então foi retirado.

**Figura 13. Arena do Campo Aberto**



**Figura 14- Aparelho de Esquiva Passiva**



Após 30 segundos foi colocado novamente compartimento iluminado. O animal ao entrar no compartimento escuro, recebeu um choque de 0,5mA, durante 1s, com o tempo de latência para entrar sendo registrado, até um máximo de 300 segundos (treino). Retirou-se o animal (alguns animais saíram espontaneamente após o choque) e após 15 minutos este foi colocado novamente no compartimento iluminado e registrou-se a latência de entrada (memória recente). A retenção do aprendizado foi testada após 24h, nesta, os animais foram colocados no compartimento iluminado e o tempo de latência para a entrada no compartimento escuro foi registrado (os animais nesta fase não levaram choque) (memória tardia).

## 6.2.2 LABIRINTO EM T ELEVADO (*T MAZE*)

Este teste para estudos de memória foi validado por Viana e cols. (1994). O labirinto foi construído em madeira, com 3 braços de dimensões idênticas (50 X 10 cm). Sendo um braço fechado por paredes de 40 cm de altura perpendicular aos dois braços abertos opostos. Para evitar a queda dos animais os braços abertos estão circundados por tira de acrílico de 1cm de altura. O labirinto está elevado 50 cm do chão (figura 15). Nos dois dias antes do teste os animais foram gentilmente manuseados durante 5 min. Após a cirurgia e quarenta e oito horas após o tratamento o teste foi realizado. Cada rato foi colocado no final do braço fechado do labirinto e o tempo gasto para sair do braço com as quatro patas foi registrado (treino). A seguir o mesmo procedimento foi repetido em dois treinos subsequentes (Esquiva 1 e 2) com 30 seg de intervalo. Três dias mais tarde (36h), o animal foi novamente colocado no labirinto e o tempo gasto para sair do braço fechado foi medido (Esquiva 3). O tempo máximo de observação (*cut off*) durante as esquivas, foi de 300 segundos).

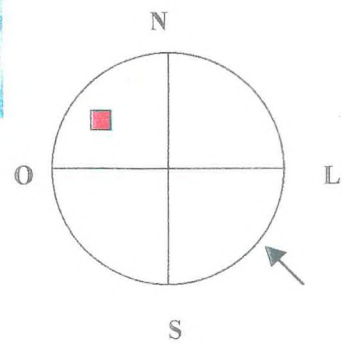
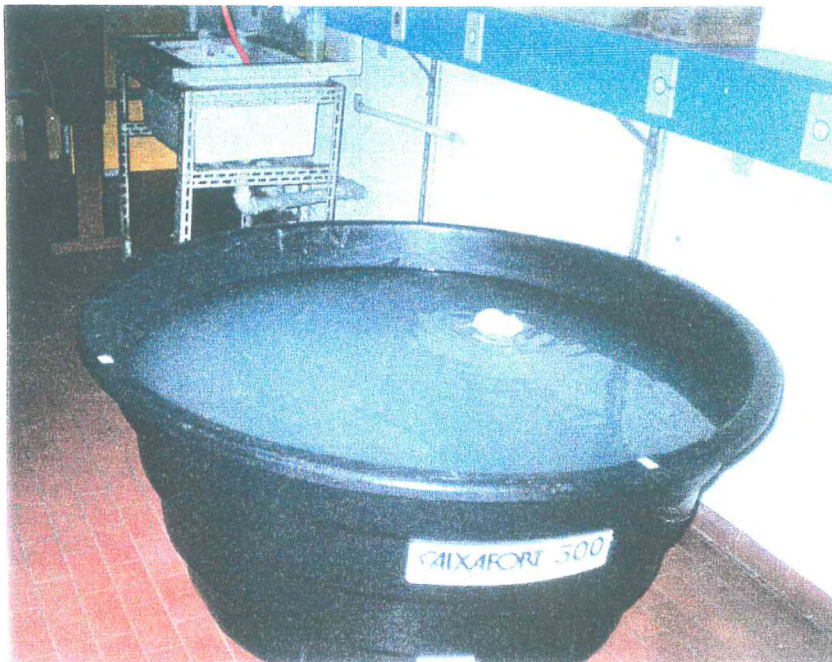
### 6.2.3 LABIRINTO AQUÁTICO (*MORRIS WATER MAZE*)

Este modelo é usado para se avaliar a memória espacial (Morris, 1984). O labirinto aquático consiste de um tanque de plástico circular (132cm de diâmetro) e paredes de 40 cm de altura, cheio (até 10cm da borda) com água (25°C) acrescida de leite em pó (para deixar a água opaca). O aparelho possui uma plataforma de acrílico (15 x 15 x 19 ) colocada no quadrante noroeste 2cm abaixo da superfície da água (Figura 16). Vinte e quatro horas após o término do tratamento com pentoxifilina, os animais iniciaram o treinamento. Foram feitos 6 treinos em dois dias consecutivos (aprendizagem) e após 48 horas os animais foram testados para avaliação da memória espacial (retenção). Durante o treino o animal foi colocado em 6 locais diferentes do tanque e teve 54 segundos para achar a plataforma submersa, em cada treino. Se o animal não encontrasse a plataforma ao final deste tempo, era colocado manualmente na mesma durante 10 segundos e retirado do tanque por 30 segundos. Ao final do segundo dia cada animal recebeu 12 treinos para a aquisição da memória. Setenta e duas horas após o treinamento, a plataforma foi removida e os animais colocados no tanque, na posição sudeste (em relação à posição da plataforma). Os animais permaneceram durante 60 segundos e o tempo de latência para alcançar o local da plataforma original e o número de quadrantes atravessados foram registrados.

Figura 15- Labirinto em T elevado



Figura 16- Labirinto Aquático



- Plataforma
- ➔ Saída do animal

## 7. DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS

A densidade de receptores muscarínicos foi determinada através de ensaios de *binding*, realizados em homogenatos de hipocampo dos ratos que se submeteram aos testes de memória, os animais foram sacrificados 24h após o termino dos testes. Em outro grupo de experimentos os animais foram tratados durante 6 dias com pentoxifilina e sacrificados no dia da última injeção. Para a determinação de receptores muscarínicos  $M_1+M_2$ -símile foi utilizado o ligante não específico  $^3\text{[H]}$ -N-metilescopolamina ( $^3\text{[H]}$ -NMS, 85 Ci/mmol-New England Nuclear, USA), de acordo com método previamente descrito (Dombrowski *et al.*, 1983).

### Método

O antagonista muscarínico marcado,  $^3\text{[H]}$ -NMS, liga-se a sítios específicos dentre os quatro primeiros segmentos transmembrânicos 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  $^3\text{[H]}$ -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.

### **Procedimento experimental**

Após a dissecação do hipocampo em gelo, foram preparados homogenatos a 10% em tampão fosfato de sódio, 150mM, pH 7,4. Os homogenatos contendo 150-180 µg de proteína (o volume varia com a concentração de proteína, em torno de 10 a 20µL), foram incubados em tampão fosfato de sódio (o volume varia de acordo com o volume do homogenato, até atingir um volume final de 0,2 mL) contendo 2,35 nM de  $^3\text{[H]}$ -NMS (40µL), na presença ou ausência de sulfato de atropina 12,5 µM (5µL), para experimentos de ponto único. A concentração do ligante pode variar, devendo-se fazer uma curva de saturação para o ligante que estiver sendo utilizado.

Após incubação a 37°C por 30 minutos, com agitação, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os filtros foram lavados três vezes com 4ml de solução salina 0,9% gelada cada vez, secos a 60°C por no mínimo 2 horas e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3ml 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 calculada na presença de atropina, 12,5 µM. Os resultados foram expressos como fmoles/mg de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry *et al.*, 1951, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

### **Soluções reagentes**

- Coquetel de cintilação- 0,5g 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) dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

- Solução de atropina 0,5mM- Sulfato de atropina (Sigma, St Louis, MO, USA) em água bidestilada.

- Solução estoque de  $^3\text{[H]}$ -N-metil-escopolamina ( $^3\text{[H]}$ -NMS) 23,52nM- Cloridrato de  $^3\text{[H]}$ -NMS (85 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), em tampão fosfato de sódio 150mM, pH 7,4.

- Tampão fosfato de sódio 150mM, pH 7,4-  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) dissolvido em água bidestilada.

### Cálculo

$$\frac{\text{cpm amostra (média)} - \text{cpm branco}}{\text{proteína}} \div \text{atividade específica do ligante} \times 1000 =$$

$$= \text{densidade dos receptores muscarínicos em fmoles/mg de proteína}$$

cpm- cintilações por minuto

## 8. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE $\text{AMP}_c$

### Preparação de homogenatos

Foi preparado um homogenato do hipocampo a 20% em tampão TRIS EDTA 4mM (para o ensaio de  $\text{AMP}_c$ ) Após o aquecimento, por 10 minutos em banho-maria (80-100°C), o homogenato foi centrifugado (10.000 rpm) durante 10 minutos e o sobrenadante usado para o ensaio.

### Método

A concentração de  $\text{AMP}_c$  foi medida através de radioimunoensaio usando um kit comercial (*Cyclic AMP assay system*, Amersham, USA). O ensaio é baseado na



competição entre o AMP<sub>c</sub> não marcado (“frio”) e uma quantidade fixa do composto marcado tritiado para se ligar a uma proteína de *binding* que tem alta afinidade e especificidade para o AMP<sub>c</sub> (Tovey *et al.*, 1974). A quantidade do complexo formado marcado, AMP<sub>c</sub>-proteína, é inversamente proporcional à quantidade de AMP<sub>c</sub> não marcado presente na amostra utilizada no ensaio. A separação do AMP<sub>c</sub> 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 a contagem da radioatividade por cintilação líquida. A concentração do AMP<sub>c</sub> não marcado é então determinada através de curva padrão linear.

### **Reagentes do kit comercial**

- Tampão Tris EDTA
- Proteína de *binding* purificada de músculo bovino
- 8-<sup>3</sup>[H]-AMP<sub>c</sub>: 8-<sup>3</sup>[H]-3',5'-fosfato cíclico de adenosina tritiado, 180 pmol contendo 5μCi
- AMP<sub>c</sub> padrão: 3,5-fosfato de adenosina cíclico , 1600pmol
- Adsorvente de carvão
- Sulfato de amônia

### **Medida da Radioatividade**

Os discos de papel de filtro contendo o material a ser analisado foram colocados em frascos apropriados (*vials*) contendo 1ml de um coquetel de cintilação líquida miscível em água, READY FLOW III (AMBRIEX S/A). A radioatividade foi medida em contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com uma eficiência de 48%. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína.

### Protocolo do ensaio

Tubo	Tampão	Padrão	Amostra	[ <sup>3</sup> H]AMPc	Proteína de binding	Concentração
1,2	150	---	---	50	---	Branco
3,4	50	---	---	50	100	Dose zero
5,6	---	50	---	50	100	1pmol
7,8	---	50	---	50	100	2pmol
9,10	---	50	---	50	100	4pmol
11,12	---	50	---	50	100	8pmol
13,14	---	50	---	50	100	16pmol
15, etc	---		50	50	100	Desconhecido

Todos os volumes são em microlitros

Após a colocação de todos os reagentes, os tubos foram incubados por 2 h na geladeira. Em seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de carvão e a mistura centrifugada. Foi retirado 200  $\mu$ L do sobrenadante, colocados nos vidros, adicionado 1 mL de líquido de cintilação miscível em água e a cintilação medida em cintilador.

#### Cálculo:

- Branco- cpm dos tubos 1 e 2
- $C_0$  (ausência de AMPc não ligado)- cpm dos tubos 3 e 4 menos o branco
- $C_x$  (AMPc ligado)- média da cpm dos outros tubos (duplicatas) menos branco (AMPc ligado, na presença de AMPc não ligado presente nos padrões e na amostra)
- Fazer a equação da reta plotando  $y = C_0 / C_x$  contra  $x =$  concentração do padrão, e usar a equação para determinar a concentração das amostras.

## 9. DOSAGEM DE NITRITO/NITRATO (Green *et al.*, 1981)

### **Princípio:**

O reativo de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1% em água, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%) revela a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com um pico de absorvância em 560 nm.

### **Reagentes utilizados:**

Need 0,1% (N-1-naftiletilenodiamina )

Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5%

**Reagente de uso (Reagente de Griess):** Misturar partes iguais de Need 0,1%, H<sub>2</sub>O bidestilada, sulfanilamida a 1% e ácido fosfórico a 5%

**Curva padrão:** Solução de NaNO<sub>2</sub> estoque (10 mM em tampão). Foram feitas diluições em série e usadas na obtenção da curva padrão (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 1,32; 0,75 µM).

### **Protocolo:**

Para a realização do ensaio foram usados 100 µL do reagente de Griess e adicionados 100 µL do sobrenadante (centrifugado) do homogenato a 10% do hipocampo dos ratos em salina ou 100 µL dos padrões nas várias concentrações.. Para o branco foram usados 100 µL do reagente de Griess e adicionados 100 µL de salina. A leitura da absorvância foi feita em 560 nm em leitor de placa. As leituras da absorvância dos padrões (y) foram plotadas contra a concentrações de cada padrão (x), então determinou-se a equação da reta, que foi usada para a determinação da concentração de cada amostra.

## 11. AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (Dosagem do malonildialdeído- MDA) (Bernheim *et al.*, 1947)

### **Princípio:**

A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade dos radicais livres de oxigênio. O método mais empregado para a determinação do MDA em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorvância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção deste cromóforo num comprimento de onda de 535 nm e pH 1,0 é  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

### **Protocolo:**

Foram preparados homogenato a 10% do tecido hipocampal em salina, quinhentos microlitros (500  $\mu\text{L}$ ) do homogenato foram adicionados a um tubo de hemólise (em duplicata), seguidos de 500  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA a 40%) e 2,0 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA 0,67%). A mistura de reação foi colocada para ferver durante 15 min em banho maria e depois resfriada em água corrente. Em seguida a mistura foi centrifugada por 10 min a 3000 rpm. A absorvância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 530 nm contra branco (500  $\mu\text{L}$  água + 250  $\mu\text{L}$  TCA + 1mL de TBA). A curva padrão foi obtida usando solução de MDA. Foram feitas diluições em série e utilizadas na obtenção da curva padrão (1; 0,5; 0,25; 0,12; 0,06; 0,03mM). A concentração de MDA foi expressa em nmoles/g de tecido.

## 12. AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PENTOXIFILINA NOS TREMORES INDUZIDOS PELA OXOTREMORINA (Olton & Samuelson, 1976)

Camundongos Swiss machos (20-25g) foram usados para a investigação dos efeitos da pentoxifilina nos tremores induzidos pela oxotremorina. Os animais (10-19 por grupo) foram tratados com pentoxifilina nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, i.p., 30 minutos antes da injeção de oxotremorina (0,3 mg/kg, i.p.). Em outro grupo de animais foi feito um tratamento prévio com atropina (10 mg/kg), 15 min antes da injeção de pentoxifilina (100 mg/kg). A oxotremorina foi injetada e os camundongos colocados em um recipiente de plástico, 30 min após, foi feita a observação da intensidade dos tremores de cada animal segundo a seguinte escala de escores: 0- nenhum comportamento anormal foi observado, 1- tremores fracos, 2- tremores moderados e ocasionais, 3- tremores moderados e persistentes, 4- tremores fortes e persistentes. A observação dos tremores foi feita com intervalos de 5 minutos, começando 30 min após a injeção da oxotremorina e a intensidade dos tremores foi determinada como a média do total de escores durante os 30 min do teste.

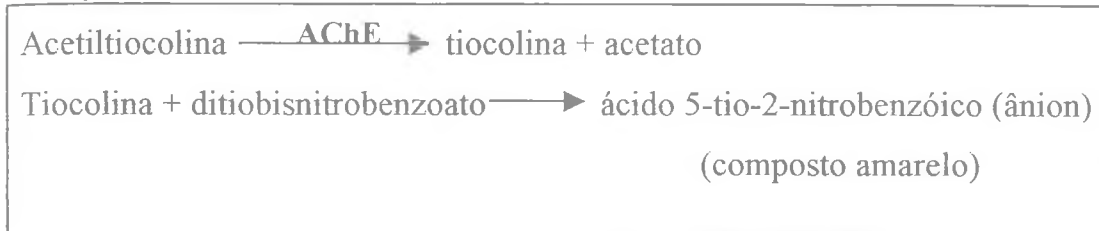
## 13. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE (AChE)

### **Princípio:**

A atividade acetilcolinesterásica (AChE) foi determinada de acordo com o método de Ellman e cols. (1961). O método é baseado na medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetilcolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditio-bis-2 nitrobenzoato, para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2

nitrobenzóico. A atividade enzimática foi medida através da variação da absorbância, durante 4 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos. As leituras das absorbâncias foram feitas em 412 nm. A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisado por miligrama de proteína por minuto.

**Reação:**



**Reagentes:**

- Solução do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico, DTNB (Sigma, St Louis, MO, USA) 10mM 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: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), 0,1 N em água bidestilada, pH 8,0

**Técnica (*in vitro*):**

Na cubeta de leitura foram incubados, 890 µL de tampão fosfato (pH 8,0), 485 µL de água bidestilada, 10 µL do homogenato do tecido hipocampal a 10% em tampão fosfato, 15 µL da pentoxifilina (500 e 1000 µM), durante 30min, à temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 50 µL de DTNB, o espectrofotômetro foi zerado num comprimento de onda de 412 nm e então foram adicionados 50 µL de ATC à cubeta. As leituras foram iniciadas feitas nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 min. O resultado foi expresso em atividade da AChE em nmoles/mg de tecido/min.

**Cálculo:**

$\Delta$  densidade ótica (DO)/4min

coeficiente de extinção do ânion amarelo formado- 0,0136  $\mu$ M

quantidade de tecido- 1mg em 15 $\mu$ L

volume final na cubeta- 1,5mL

$$\frac{\Delta (DO)/4\text{min}}{0,0136} \times 1,5 = \boxed{\text{Atividade da AChE em nmoles/mg de tecido/min}}$$

## 14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados testes não paramétricos (Friedman, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney) para a análise estatística dos testes comportamentais (campo aberto, esQUIVA passiva, labirinto em T elevado, labirinto aquático) e ANOVA e teste de Tukey-Kramer para os teste paramétricos. Os programas de computadores usados foram Stateview (para Macintosh) e Graph Pad InStat (para PC). Na análise histológica da lesão foram feitos os testes de Kruskal-Wallis e Dunn. No modelo de campo aberto foi utilizado os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, no modelo do labirinto em T elevado foram feitos os testes de Friedman, para a análise das diferenças dentro dos tratamentos e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para a análise entre os tratamentos. No modelo de esQUIVA passiva foram utilizados ANOVA para a análise das diferenças dentro dos tratamentos e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para a análise entre os tratamentos. No modelo do labirinto aquático de Morris foram utilizados os testes de ANOVA-medidas repetidas para a análise das diferenças entre os treinos e Kruskal-Wallis e Mann-Whitney para a análise entre os tratamentos. No teste da avaliação dos tremores induzidos pela oxotremorina foram

usados os testes de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Nos testes de dosagem de AMPc, *binding* muscarínico, nitrito/nitrato, malonildialdeído e atividade de AChE foram feitos análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey-Kramer. Com o critério de significancia de  $p < 0,05$ .



#### ***IV- RESULTADOS***

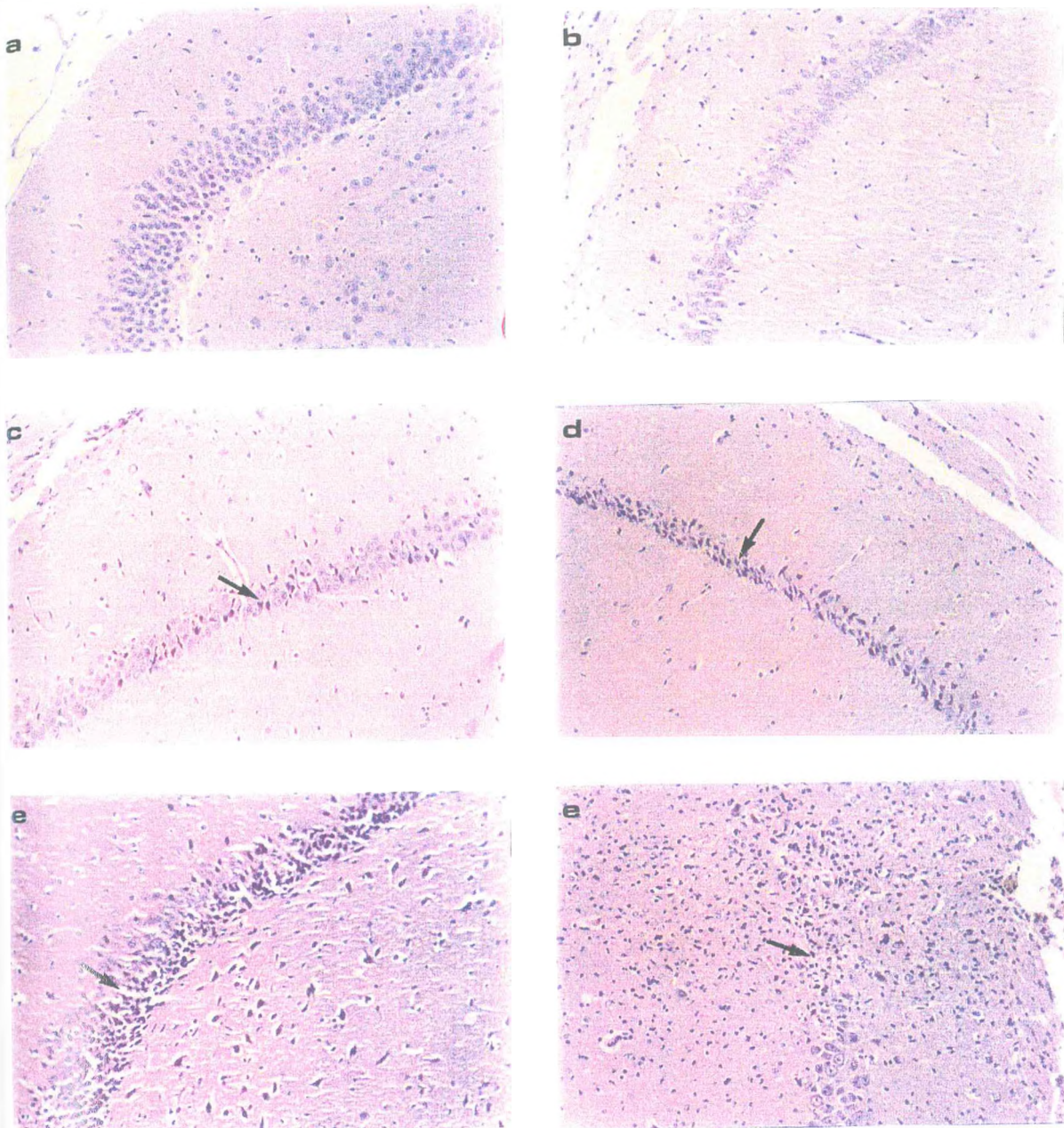
---

## IV- RESULTADOS

---

### 1. ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS EFEITOS DO GLUTAMATO NO HIPOCAMPO DE RATO

A figura 17(a-e), mostra as lesões produzidas pelo glutamato (24, 48, 96 e 192  $\mu\text{g}$ ) injetado através de estereotaxia no hipocampo dos ratos (coordenadas segundo Paxinos, ver Material e Métodos). Podemos observar a presença de gliose, picnose nuclear, vacuolização citoplasmática e um desarranjo das células piramidais que formam a paliçada, algumas vezes fora da região injetada (tálamo), isto na maior dose. Estas alterações não foram observadas no grupo controle, que recebeu somente salina. Em algumas lâminas de todos os grupos, foram visualizadas lesões no trajeto da agulha (gliose), este tipo de lesão não foi levada em consideração no momento da análise. O glutamato causou lesões moderadas e severas em doses maiores (96 e 192  $\mu\text{g}$ ) (% do número de animais com lesão: **glu24** (n- 4): ausente- 75%, leve- 25%; **glu48** (n- 7): ausente- 57,2%, leve- 42,8%; **glu96** (n- 17): leve- 17,6%, moderada- 52,9%, grave- 29,5%; **glu192** (n- 8): moderada- 33,3%, grave- 66,7%, com um aumento também na gravidade das lesões (Tabela 2). (KW-33,424,  $p < 0.001$ , Kruskal-Wallis e teste de Dunn para múltiplas comparações).



**Figura 17.** Alterações histopatológicas produzidas pelo glutamato em hipocampo de rato. Os animais foram injetados com glutamato na região hipocampal (CA1 e CA3) (coordenadas segundo Paxinos, ver material e métodos) e após 15 dias foram sacrificados, os cérebros fixados, montados em parafina e corados por H-E. a- salina; b- glu 24 $\mu$ g; c- glu 48 $\mu$ g; d- glu 96 $\mu$ g; e- glu 192 $\mu$ g. As setas indicam células em picnose, vacuolização e destruição de paliçada. Coloração HE e aumento de 100x.

**Tabela 2. Alterações histopatológicas induzidas pelo glutamato no hipocampo de rato**

Grupos	Lesão (%)				Nº de animais
	Ausente	Leve	Moderada	Grave	
Salina	100.0	----	----	----	07
Glutamato ( $\mu\text{g}$ )					
24	75.0	25.0	----	----	04
48	57.2	42.8	----	----	07
96	----	17.6	52.9	29.5	17 <sup>a,b</sup>
192	----	----	33.3	66.7	08 <sup>a,b</sup>

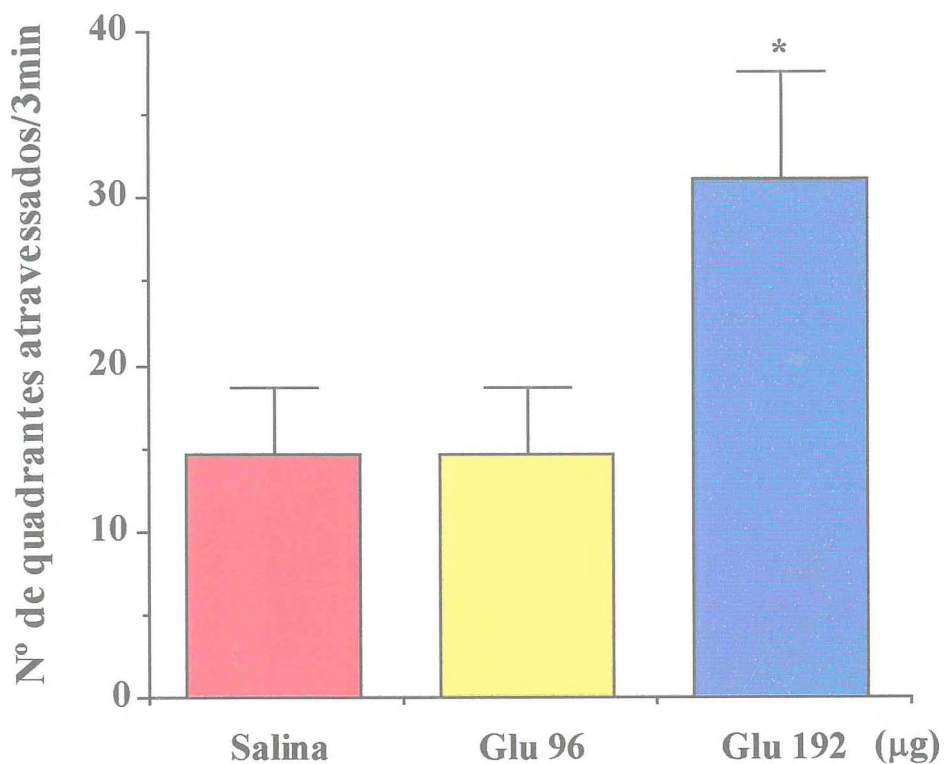
Os resultados foram expressos como a porcentagem do número de animais que apresentaram a seguinte escala de escores: 0 ou ausente - Ausência de lesão no hipocampo; leve ou 25% - mais de 25% e menos que 50% de lesão no hipocampo; moderada ou 50% - mais de 50% e menos que 75% de lesão no hipocampo; grave - mais de 75% de lesão no hipocampo <sup>a</sup> vs salina, <sup>b</sup> vs glu 48, Kruskal-Wallis ( $p < 0,001$ ) e teste de Dunn ( $p < 0,01$ ).

## 2. EFEITO DO GLUTAMATO NA ATIVIDADE LOCOMOTORA (TESTE DO CAMPO ABERTO)

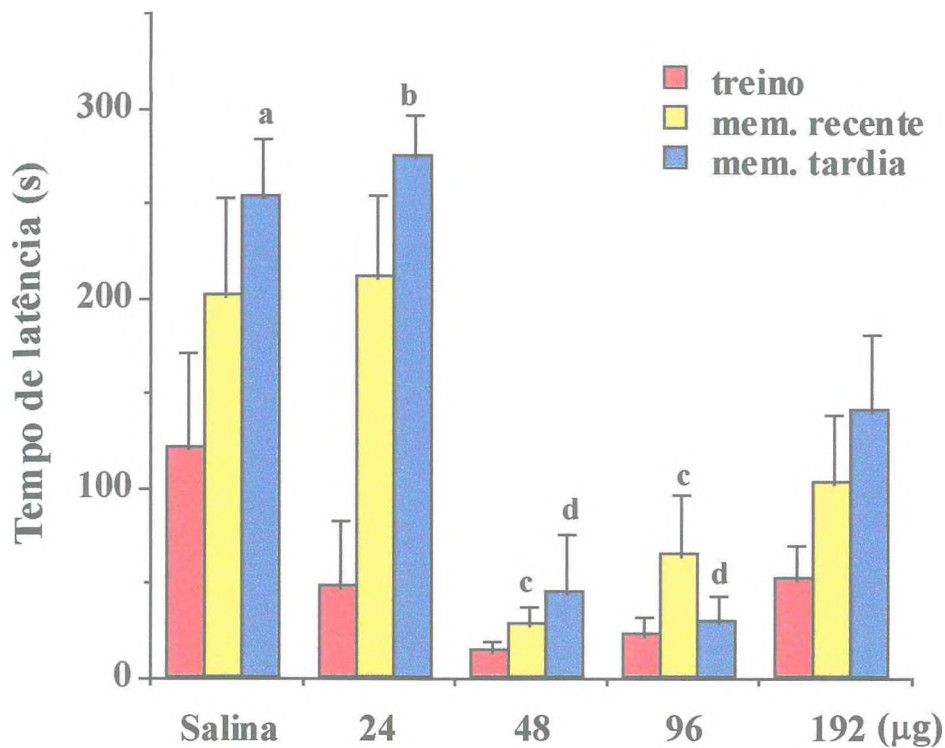
Como ilustrado na figura 18, o glutamato (glu) na dose de 192 µg, afetou a atividade locomotora dos ratos, tendo sido observado um aumento significativo da atividade, na maior dose: **salina**- (n- 17):  $14,82 \pm 2,59$ ; **glu96** (n- 16):  $14,62 \pm 4,04$ ; **glu192** (n-7):  $31,1 \pm 6,50$  quadrantes atravessados durante 3 min ( $p < 0,05$ , Kruskal-Wallis, KW- 6,579 e Mann-Whitney, salina vs glu192,  $p < 0,02$ ). Foi realizado o teste em um grupo de animais não operado e os resultados (não operado (n-6):  $14,67 \pm 4,28$  quadrantes) não foram diferentes daqueles do grupo salina (falso-operado). A dose de 96µg foi escolhida para os tratamentos, visto que o aumento da atividade locomotora poderia interferir com os testes de memória.

## 3. EFEITO DO GLUTAMATO NO TESTE DA ESQUIVA PASSIVA

No teste da esQUIVA passiva os animais aprendem a evitar o choque (treino) não entrando no lado escuro do aparelho, quando avaliados 15 minutos após o choque (memória recente) ou 24 horas após o choque (memória tardia). A figura 19 mostra que os animais do grupo controle (tratados com salina) apresentaram uma boa retenção da memória, tanto na fase imediata (memória recente), quanto na fase de consolidação (memória tardia), quando comparado ao comportamento destes animais durante o treino (ANOVA) (**salina** (n-7): treino-  $120,80 \pm 50,40s$ , memória recente-  $200,43 \pm 52,09s$ , memória tardia-  $252,57 \pm 31,78s$ ,  $F(2,30) = 6,088$ ,  $p < 0,006$ ). O teste também foi feito com animais não operados para avaliação dos parâmetros normais e os resultados não mostraram nenhuma diferença entre este grupo e o grupo salina (falso-operado)(**não operados**- (n-16): treino-  $112,61 \pm 33,05$



**Figura 18. Efeito do glutamato na atividade locomotora (teste do campo aberto) de ratos.** Os animais foram injetados no hipocampo com glutamato (96 e 192µg/2,4 µL) ou salina e após sete dias foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do número de quadrantes atravessados pelos animais durante 3 minutos. O número de animais por grupo variou de 7 a 16. \* vs salina  $p < 0,02$  (teste de Mann-Whitney).



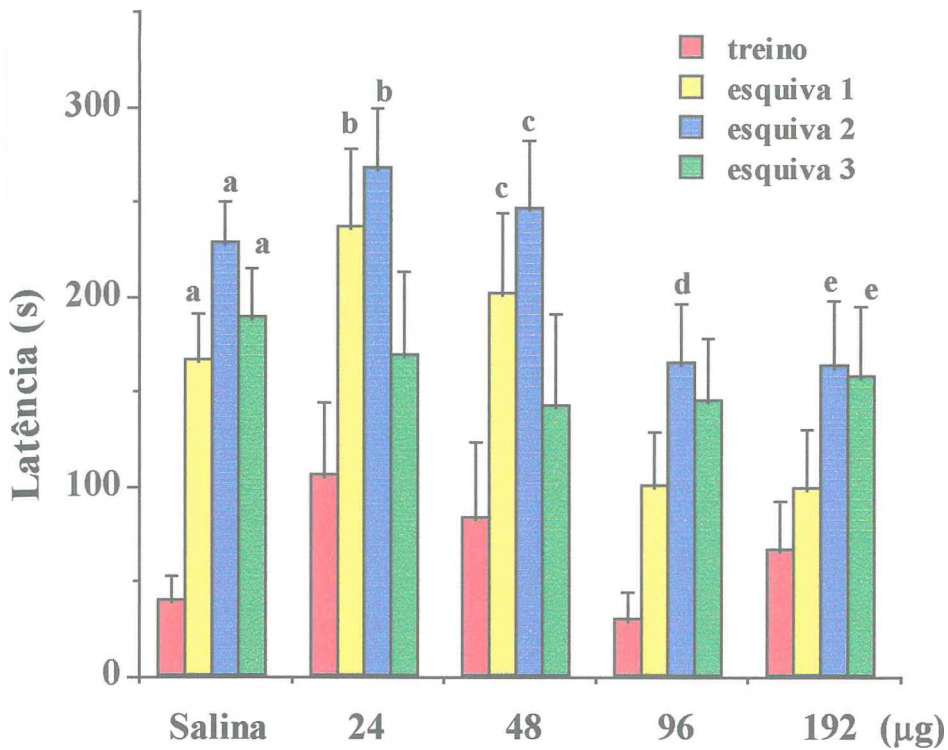
**Figura 19. Efeito do glutamato no teste da Esquiva Passiva em ratos.** Os animais foram injetados no hipocampo com glutamato (24, 48, 96 e 192µg/2,4 µL) ou salina e após nove dias foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM do tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho. O número de animais por grupo variou de 7 a 12. a: vs salina (treino), b: glu24 (treino), c: vs salina (memória recente), d: vs salina (memória tardia),  $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

memória recente-  $227,44 \pm 27,34s$ , memória tardia-  $224,41 \pm 30,26s$ ,  $F(2,45)=4,662$ ,  $p < 0,01$ ). Os animais tratados com glutamato na dose de  $24 \mu g$  também apresentaram uma boa retenção de memória (**glu24** (n-8): treino  $47,10 \pm 36,20s$ ; memória recente-  $210,20 \pm 44,77s$ , memória tardia-  $273,70 \pm 22,27s$ ,  $F(2,21)=10,751$   $p < 0,0006$ ). Por outro lado, os animais lesionados com glutamato (nas doses de  $48, 96$  e  $192 \mu g$ ) não apresentaram diferença no tempo de latência de entrada no lado escuro, significando um déficit nos processos de aprendizagem e memória (**glu48** (n-9): treino-  $14,64 \pm 5,19s$ , memória recente-  $27,61 \pm 9,89s$ , memória tardia-  $44,35 \pm 32,21s$ ,  $F(2,24)=0,572$ ,  $p < 0,572$ ); **glu96** (n-12): treino-  $22,87 \pm 9,05s$ , memória recente-  $64,46 \pm 31,93s$ , memória tardia-  $29,39 \pm 14,54s$ ,  $F(2,33)=1,143$ ,  $p < 0,331$ ); **glu192** (n-12): treino-  $51,36 \pm 19,53s$ , memória recente-  $103,28 \pm 36,23s$ , memória tardia-  $140,29 \pm 40,76s$ ,  $F(2,33)=1,783$ ,  $p < 0,183$ ), o que indica dano na aquisição e retenção da memória. Comparando os tratamentos observamos uma diminuição significativa, no tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho, nos ratos tratados com glutamato ( $48$  e  $96 \mu g$ ) quando avaliados tanto na memória recente (**salina**:  $200,43 \pm 52,09s$ ; **glu24**:  $210,2 \pm 44,77s$ ; **glu48**:  $27,61 \pm 9,89s$ ; **glu96**:  $64,46 \pm 31,93s$ ; **glu192**:  $103,28 \pm 36,23s$ , Kruskal-Wallis, KW-11,508,  $p < 0,02$ , Mann-Whitney, glu 48 e 96 vs salina,  $p < 0,05$ ), quanto na memória tardia (**salina**:  $252,57 \pm 31,78s$ ; **glu24**:  $273,7 \pm 22,27s$ ; **glu48**:  $44,35 \pm 32,21s$ ; **glu96**:  $29,39 \pm 14,54s$ ; **glu192**:  $140,29 \pm 40,76s$ , Kruskal-Wallis, KW-16,014,  $p < 0,01$ , Mann-Whitney, glu 48 e 96 vs salina,  $p < 0,05$ ), significando uma dificuldade do animal em lembrar o choque recebido durante o treino, podendo indicar uma lesão no sistema límbico, mais precisamente na região que abrange o hipocampo, já que este teste é utilizado como ferramenta para estudo da memória emocional.



#### 4. EFEITO DA LESÃO HIPOCAMPAL COM GLUTAMATO NO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO EM RATOS

No teste do labirinto em T elevado, o animal aprende a ficar no braço fechado do aparelho, evitando explorar o lado aberto, uma característica inata do animal. É testado por duas vezes (esquiva 1 e 2) no primeiro dia (aprendizagem) e novamente após 72 horas, para que seja observado a retenção do aprendizado ou memória. Neste teste o animal não recebe estimulação aversiva do tipo choque ou inanição, mas aprende a evitar o espaço aberto, evitando cair, assim o aprendizado é baseado no comportamento exploratório do animal, podendo-se inferir que este modelo se baseia em um tipo de memória não declarativa. O teste de Friedman mostrou uma diferença significativa na latência de esquiva (esquiva 1, 2 e 3 quando os animais são comparadas aos seus respectivos treinos) nos grupos: **salina** (n- 27): treino- 38,74 ± 14,67s; esquiva 1- 165,44 ± 25,94s; esquiva 2- 227,57 ± 22,09s; esquiva 3- 188,12 ± 26,66s,  $\chi^2(3)= 23,78$ ,  $p < 0,0001$ , **glu24** (n- 9): treino- 104,89 ± 39,91s; esquiva 1- 236,22 ± 42,19s; esquiva 2- 266,90 ± 33,10s; esquiva 3- 168,44 ± 45,09s,  $\chi^2(3)= 7,63$ ,  $p < 0,05$ , **glu48** (n- 9): treino- 82,23 ± 41,40s; esquiva 1- 201,33 ± 43,80s; esquiva 2- 246,56 ± 35,51s; esquiva 3- 141,67 ± 50,13s,  $\chi^2(3)= 8,54$ ,  $p < 0,03$ , **glu96** (n- 18): treino- 29,29 ± 15,00s; esquiva 1- 99,43 ± 30,46s; esquiva 2- 164,90 ± 31,38s; esquiva 3- 144,76 ± 33,73s,  $\chi^2(3)= 19,71$ ,  $p < 0,0002$ , **glu192** (n- 12): treino- 66,41 ± 26,21s; esquiva 1- 97,72 ± 33,36s; esquiva 2- 162,87 ± 34,97s; esquiva 3- 157,28 ± 38,37s,  $\chi^2(3)= 11,14$ ,  $p < 0,01$ . Isto indica que houve um aprendizado, mesmo nos animais lesados, apesar de menos eficiente que no grupo controle (Figura 20). Comparando os tratamentos, não observamos diferença significativa entre os grupos. Na etapa de aquisição da memória (memória recente- esquiva 1), observamos uma menor retenção nos grupos tratados com glutamato em relação ao controle, porém este resultado não foi significativo (**salina**: 165,44 ± 25,94s; **glu24**: 236,22 ± 42,19s; **glu48**: 141,67 ± 50,13s; **glu96**: 99,43 ± 30,46s;



**Figura 20. Efeito do glutamato no teste do labirinto em T elevado em ratos.** Os animais foram injetados no hipocampo com glutamato (24, 48, 96 e 192µg/2,4 µL) ou salina e após oito dias foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM do tempo de latência de saída do braço fechado do aparelho. O número de animais por grupo variou de 9 a 21. a: vs salina (treino), b: vs glu24 (treino), c: vs glu48 (treino), d: vs glu96 (treino), e: vs glu192 (treino),  $p < 0,05$ , teste de Friedman.

**glu192**:  $97,72 \pm 33,36s$  . Também foi realizado o teste em animais não operados e não foram encontradas diferenças significativas em relação ao grupo salina (falso-operado) demonstrando que a cirurgia não lesou os animais de maneira a influenciar o resultado final do teste (não operado (22)- esquiwa 2-  $277,18 \pm 11,15s$ ; esquiwa 3-  $234,95 \pm 26,18s$ ). Este teste é indicado para se testar a memória operacional, uma memória de curta duração, achamos que o mesmo não seja suficientemente adequado para estudos de memória de longa duração, em animais lesionados no hipocampo. Além disto é possível que a estocagem da memória neste teste envolva outras regiões cerebrais, tais como córtex motor e corpo estriado.

## 5. EFEITO DA LESÃO HIPOCAMPAL COM GLUTAMATO NO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS EM RATOS

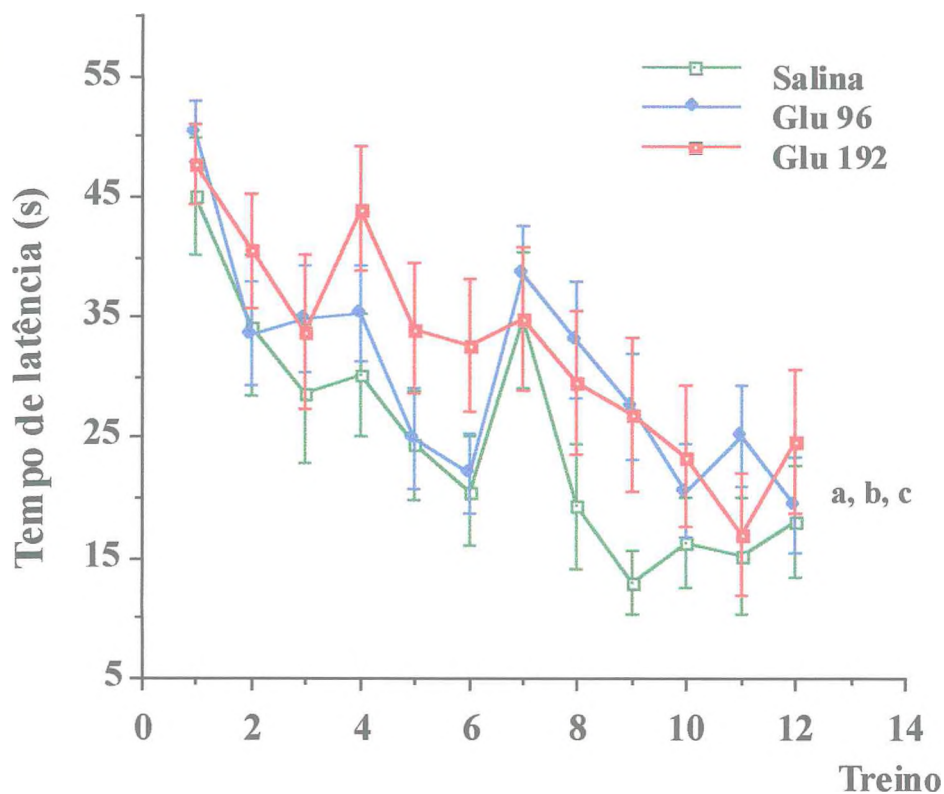
O teste do labirinto aquático é bastante utilizado para estudos de memória espacial, que é prejudicada após lesão hipocampal. Observamos que todos os grupos testados apresentaram um bom desempenho neste teste (isto é, diminuíram o tempo de latência (segundos) para encontrar a plataforma submersa ao longo do treinamento, que variaram de T1 a T12), porém os grupos tratados com glutamato tiveram um desempenho inferior, isto é gastaram um tempo maior procurando a plataforma (**salina** (n- 14): T1-  $44,97 \pm 4,80$ ; T2-  $34,23 \pm 5,84$ ; T3-  $28,69 \pm 5,74$ ; T4-  $30,14 \pm 5,05$ ; T5-  $24,38 \pm 4,58$ ; T6-  $20,54 \pm 4,51$ ; T7-  $34,76 \pm 5,64$ ; T8-  $19,26 \pm 5,26$ ; T9-  $13,00 \pm 2,62$ ; T10-  $16,33 \pm 3,77$ ; T11-  $15,11 \pm 4,82$ ; T12-  $18,12 \pm 4,66s$ , ANOVA-medidas repetidas,  $F(11,143)-4,806$ ,  $p < 0,0001$ ; **glu 96** (n- 19): T1-  $50,36 \pm 2,55$ ; T2-  $33,57 \pm 4,31$ ; T3-  $34,88 \pm 4,41$ ; T4-  $35,24 \pm 3,96$ ; T5-  $24,86 \pm 4,14$ ; T6-  $22,09 \pm 3,30$ ; T7-  $38,64 \pm 3,99$ ; T8-  $33,15 \pm 4,85$ ; T9-  $27,46 \pm 4,38$ ; T10-  $20,49 \pm 3,84$ ; T11-  $25,09 \pm 4,14$ ; T12-  $19,34 \pm 3,98s$ , ANOVA-medidas repetidas,  $F-5,241$ ,  $p < 0,0001$ ; **glu192** (n-13): T1-  $47,56 \pm 3,32$ ; T2-  $40,49 \pm 4,76$ ; T3-  $33,70 \pm 6,44$ ; T4-

43,98 ± 5,19; T5- 34,00 ± 5,38; T6- 32,56 ± 5,55; T7- 34,80 ± 6,02; T8- 29,55 ± 5,98; T9- 26,82 ± 6,46; T10- 23,44 ± 5,81; T11- 16,84 ± 5,09; T12- 24,58 ± 5,99s, ANOVA-medidas repetidas, F-3,797, p< 0,0001 (Figura 21).

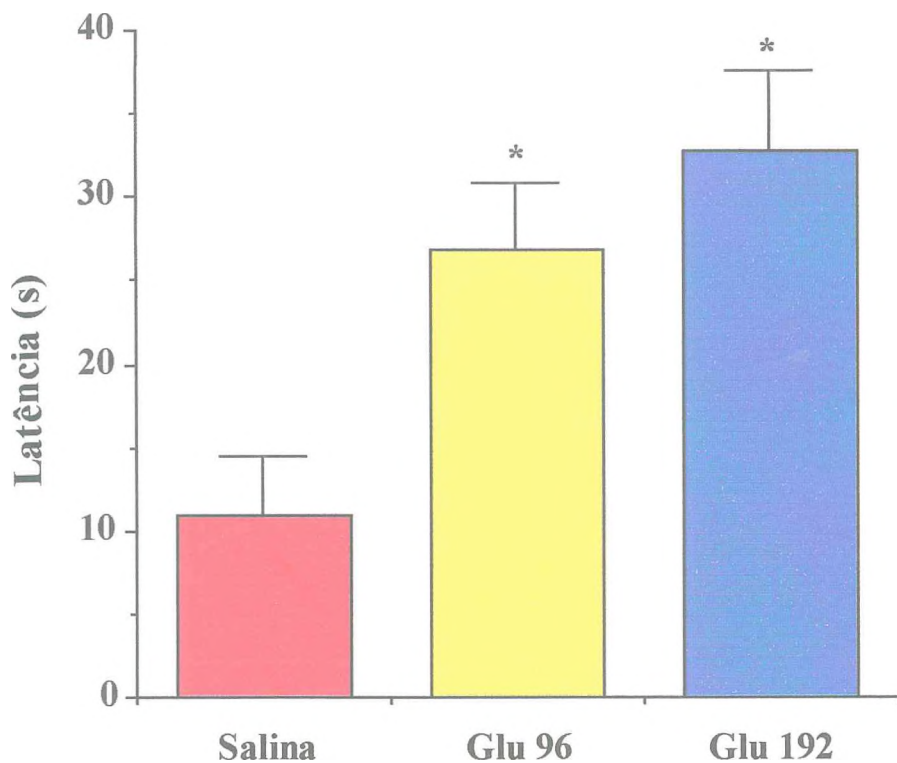
Analisando a retenção do aprendizado, pela medida do tempo de latência do animal para se situar no local em estava a plataforma, 48h após o último treino, observamos que os animais do grupo controle ainda lembravam do local, pois o tempo que eles levaram para atingir o local foi significativamente menor do que o do grupo tratado com glutamato (**salina**- 10,95 ± 3,56s; **glu96**- 26,89 ± 3,97s; **glu192**- 32,79 ± 4,78s, Kruskal-Wallis, KW- 14,550, p<0,007, Mann-Whitney glu 96 e 192 vs salina, p<0,005 (Figura 22). O tempo de latência dos animais do grupo salina (falso-operados) não foi diferente daquele dos animais não operados (não operados (n-12)- 12,90 ± 2,59s), demonstrando que a cirurgia não interferiu nos resultados. Não foi observada diferença no número de travessias de cada quadrante nos grupos tratados (**salina**- 11,65 ± 0,69; **glu96**- 10,50 ± 1,86; **glu192**- 12,23 ± 1,28 (Figura 23).

## 6. EFEITO CITOPROTETOR DA PENTOXIFILINA EM HIPOCAMPO DE RATOS LESADOS COM GLUTAMATO

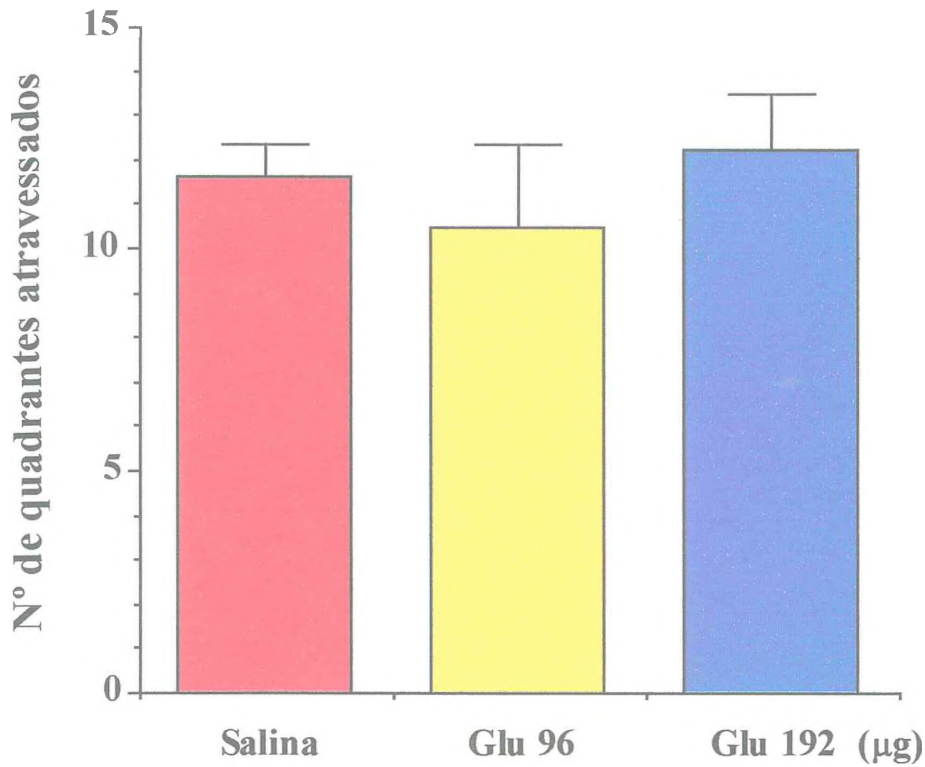
Foi utilizada a dose de 96µg, que produziu lesões do tipo moderada a severa (Figura 24-b ) no tratamento com pentoxifilina (ptx), em oposição ao grupo tratado com salina (Figura 24-a). O tratamento com ptx na dose de 100mg/kg, reverteu parcialmente as lesões hipocampais induzidas pelo glutamato (p<0.003, teste de Mann-Whitney) (Figura 24-c). Neste grupo (ptx + glu) apenas 25% dos animais apresentaram lesões moderadas e 75% lesões leves, não tendo sido observados lesões do tipo grave, se comparada ao grupo tratado somente com glutamato (96µg), que mostrou em 29,5% do animais, lesões graves e em 52,9% lesões moderadas (Tabela 3).



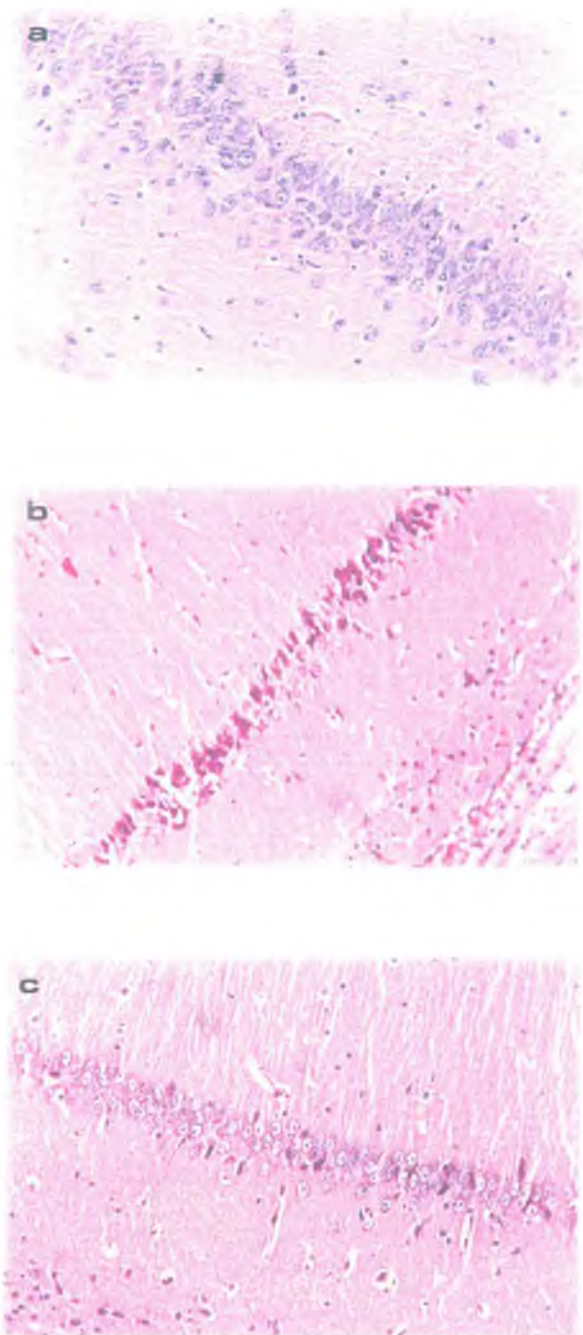
**Figura 21. Efeito do glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos- Aprendizagem.** Os animais foram injetados no hipocampo com glutamato (96 e 192 $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) ou salina e após 7 e 8 dias foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência gasto para alcançar a plataforma submersa durante os 12 treinos a que foram submetidos. O número de animais por grupo variou de 13 a 21. a vs salina (treino 1), b vs glu96 (treino 1), c vs glu192 (treino 1),  $p < 0,0001$ , ANOVA-medidas repetidas.



**Figura 22. Efeito do glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos- Retenção da memória.** Os animais foram injetados no hipocampo com glutamato (96 e 192 $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) ou salina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência gasto para alcançar o local onde estava a plataforma submersa, realizado 48 horas após o último treino. O número de animais por grupo variou de 13 a 21. \* vs salina ,  $p < 0,005$ , Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.



**Figura 23. Efeito do glutamato no teste do labirinto aquático de Morris em ratos- Número de travessias.** Os animais foram injetados no hipocampo com glutamato (96 e 192µg/2,4 µL) ou salina. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de travessias de cada quadrante durante 60 segundos, realizado 48 horas após o último treino. O número de animais por grupo variou de 13 a 21.



**Figura 24. Efeito citoprotetor da pentoxifilina em hipocampo de ratos lesados com glutamato.** Os animais foram injetados com glutamato na região hipocampal (CA1 e CA3) (coordenadas segundo atlas de Paxinose Watson, ver Material e Métodos) e após 15 dias foram sacrificados, os cérebros fixados, montados em parafina e corados por H-E. a- salina; b- glu 96µg; C- ptx100mg/kg + glu 96µg. As setas indicam células em picnose e vacuolização. Coloração HE e aumento de 200x.



**Tabela 3. Efeito citoprotetor da pentoxifilina em hipocampo de ratos lesionados com glutamato**

Grupos	Lesão (%)				Nº de animais
	Ausente	Leve	Moderada	Grave	
Salina	100,0	----	----	----	7
Glutamato 96µg	----	17,6	52,9	29,5	17
Ptx100* + Glu96	----	75,0	25,0	----	12 <sup>a</sup>

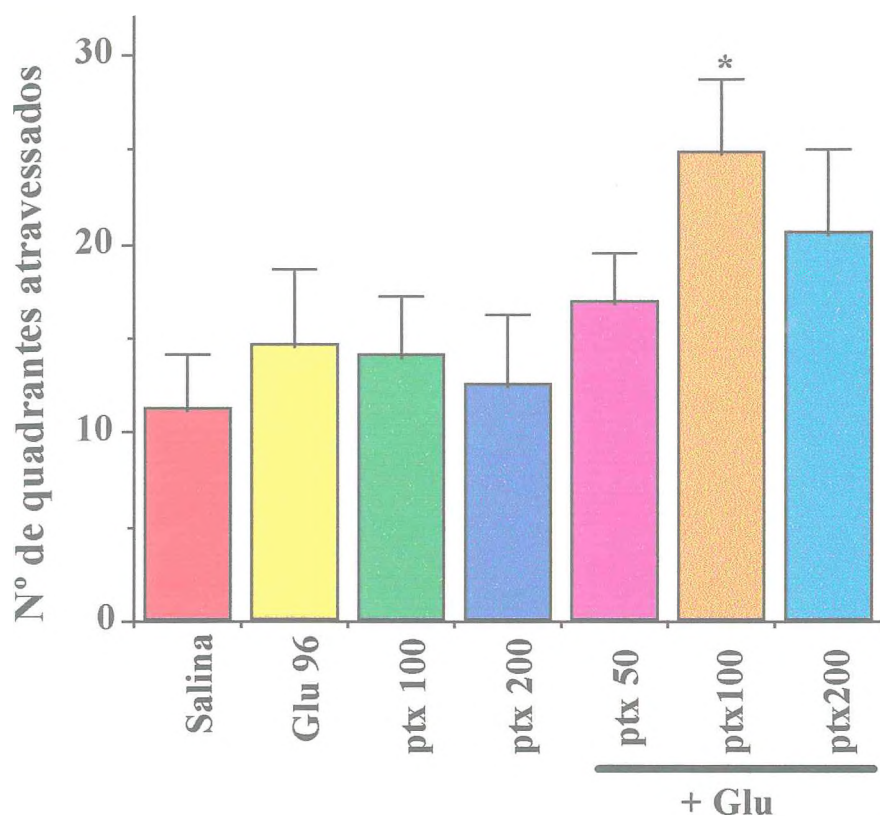
Os resultados foram expressos como a percentagem do número de animais que apresentaram a seguinte escala de escores: 0 ou ausente - Ausencia de lesão no hipocampo; leve ou 25% - mais de 25% e menos que 50% de lesão no hipocampo; moderada ou 50% - mais de 50% e menos de lesão no hipocampo; grave - mais de 75% de lesão no hipocampo. \* Ptx100: pentoxifilina 100mg/kg, i.p., administrada por 6 dias, após a injeção intrahipocampal de glutamato. <sup>a</sup> vs glutamato,  $p < 0,003$ , teste de Mann-Whitney.

## 7. EFEITO DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL COM GLUTAMATO, NO TESTE DO CAMPO ABERTO

Os animais foram tratados com pentoxifilina nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, i.p. 15 min antes da lesão com glutamato. Não foram encontradas diferenças na atividade locomotora, observada pelo número de quadrantes atravessados, nos grupos tratados com **salina** (n- 17):  $14,82 \pm 2,59$  quadrantes, **glu96** (n- 16):  $14,62 \pm 4,04$ , **ptx100** (n- 9):  $14,00 \pm 3,24$ , **ptx200** (n- 8):  $12,50 \pm 3,76$ , **ptx50 + glu96** (n- 9):  $16,89 \pm 2,68$  e **ptx200 + glu96** (n- 13):  $20,54 \pm 4,57$ . Entretanto, foi observado um aumento significativo na atividade locomotora no grupo **ptx100 + glu96** (n- 16):  $24,81 \pm 4,00$  quando comparado com o grupo tratado com glu (Mann-Whitney, U=24,00,  $p < 0,02$ ) e com o grupo tratado com salina (Mann-Whitney, U=79,500,  $p < 0,04$ ) (Figura 25). Um aumento na atividade locomotora é consistente com a hipótese de disfunção hipocampal e no presente trabalho, este efeito foi aumentado na presença de pentoxifilina.

## 8. EFEITO DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO

O teste de Friedman mostrou uma diferença significativa na latência de esquiava (esquivas 1, 2 e 3 quando comparadas aos seus respectivos treinos) nos grupos tratados, com exceção do grupo ptx200 e do grupo lesado com glutamato e tratado com ptx na dose de 50mg/kg: **salina** (n- 27): treino-  $38,74 \pm 19,05s$ ; esquiava 1-  $165,44 \pm 25,94s$ ; esquiava 2-  $227,57 \pm 22,09s$ ; esquiava 3-  $188,12 \pm 26,66s$ ,  $\chi^2(3) = 23,78$ ,  $p < 0,0001$ , **glu96** (n- 18): treino-  $29,29 \pm 15,00s$ ; esquiava 1-  $99,43 \pm 30,46s$ ;



**Figura 25. Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato, no teste do Campo Aberto.** Os animais foram lesados com glutamato (96  $\mu\text{g}/2,4 \mu\text{L}$ ) na região hipocampal e imediatamente tratados com ptx (50, 100 ou 200 mg/kg i.p., durante 6 dias). Os animais do grupo controle e ptx100 mg/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu\text{L}$ ) intrahipocampal. Vinte e quatro horas após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do número de quadrantes atravessados pelos animais durante 3 minutos. O número de animais por grupo variou de 8 a 16. \* vs Glu 96,  $p < 0,04$ , teste de Mann-Whitney.

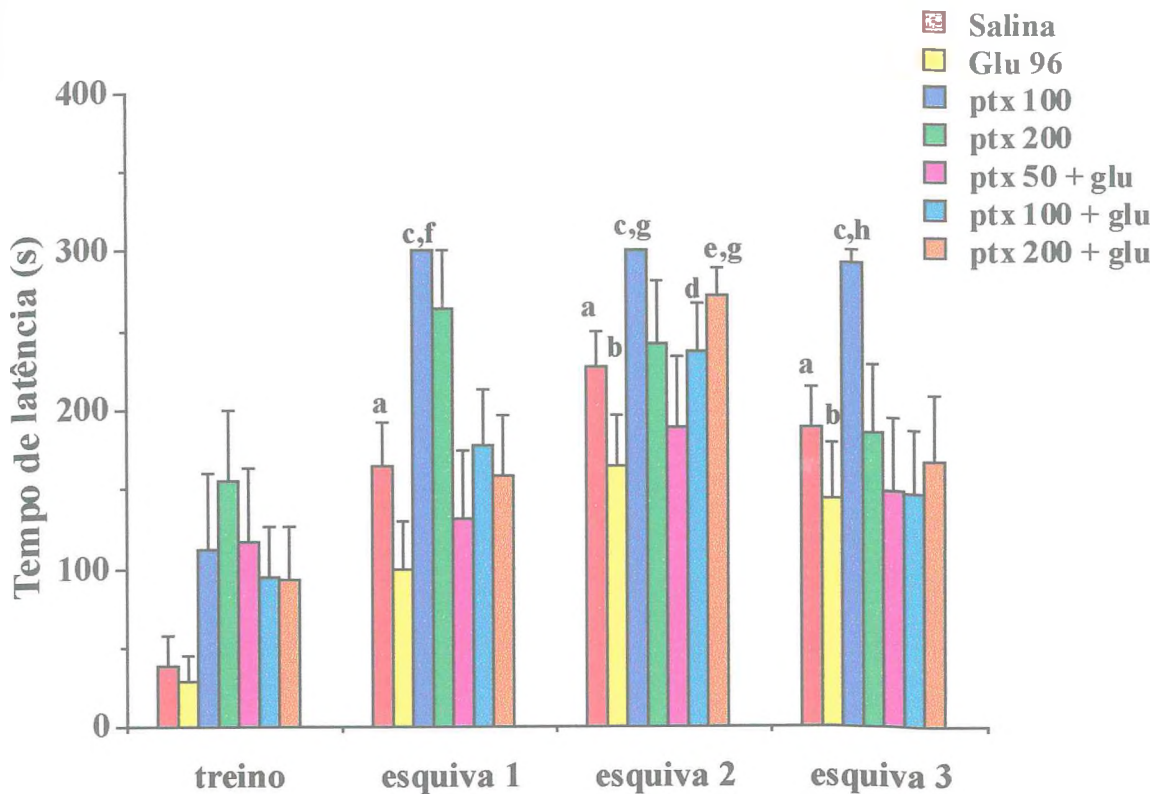
esquiva 2-  $164,90 \pm 31,38s$ ; esquiva 3-  $144,76 \pm 33,73s$ ,  $\chi^2(3)= 19,71$ ,  $p < 0,0002$ , **ptx100** (n- 9): treino-  $112,51 \pm 46,95s$ ; esquiva1-  $300,00 \pm 0,00s$ ; esquiva 2-  $300,00 \pm 0,00s$ , esquiva 3-  $293,56 \pm 6,44s$ ,  $\chi^2(3)= 16,85$ ,  $p < 0,0008$ , **ptx200** (n- 8): treino-  $154,75 \pm 44,73s$ ; esquiva 1-  $263,58 \pm 36,42s$ ; esquiva 2-  $242,22 \pm 39,83s$ , esquiva 3-  $185,60 \pm 43,99s$ ,  $\chi^2(3)= 6,19$ ,  $p < 0,102$ , **ptxt50 + glu** (n- 9): treino-  $117,53 \pm 44,89s$ ; esquiva 1-  $130,74 \pm 44,26s$ ; esquiva 2-  $188,99 \pm 44,57s$ , esquiva 3-  $148,88 \pm 46,73s$   $\chi^2(3)= 5,887$ ,  $p < 0,117$ , **ptx100 + glu** (n- 16): treino-  $94,67 \pm 32,12s$ ; esquiva 1-  $178,20 \pm 34,27s$ ; esquiva 2-  $237,42 \pm 29,06s$ ; esquiva 3-  $147,32 \pm 39,62s$ ,  $\chi^2(3)= 14,056$ ,  $p < 0,0028$ , e **ptx200 + glu** (n- 13): treino-  $93,08 \pm 33,83s$ ; esquiva 1-  $157,66 \pm 38,73s$ ; esquiva 2-  $272,15 \pm 17,53s$ , esquiva 3-  $168,32 \pm 41,07s$ ,  $\chi^2(3)= 9,509$ ,  $p < 0,0023$ . Isto indica um bom aprendizado e retenção da memória. Entretanto, o desempenho do grupo tratado com glutamato não foi tão eficiente. Observamos que nos grupos tratados com pentoxifilina e não lesados, o aprendizado foi muito eficiente, superando inclusive àquele do controle. Nos animais lesados e tratados com pentoxifilina na dose de 200mg/kg observamos uma melhora em relação ao grupo lesado, significando que a droga melhora os déficits de aprendizado induzido por lesão hipocampal com glutamato (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ) na esquiva 2 (**salina**:  $227,57 \pm 22,09s$ ; **glu**:  $164,90 \pm 31,38s$ ; **ptx100**:  $300,00 \pm 0,00s$ ; **ptx200**:  $242,22 \pm 39,83s$ ; **ptx100+glu**:  $237,42 \pm 29,06s$ ; **ptx200+glu**:  $272,15 \pm 17,53s$ . Embora a consolidação da memória tenha sido bem mantida no grupo não lesado e tratado com pentoxifilina 100mg/kg, em comparação aos outros grupos, mostrando que a droga tem um efeito de aumentar a retenção da memória, *per si*, nenhuma diferença foi detectada entre os outros tratamentos na esquiva 3 (**salina**:  $188,51 \pm 26,66$ ; **glu**:  $144,76 \pm 33,74$ ; **ptx100**:  $293,55 \pm 6,44$ ; **ptx200**:  $185,25 \pm 32,45$ ; **ptx50 + glu**:  $148,88 \pm 46,73$ ; **ptx100 + glu**:  $147,32 \pm 39,62$ ; **ptx200 + glu**:  $168,32 \pm 41,07$ ). O teste de Mann-Whitney (MW) mostrou uma diferença significativa entre a latência de saída para o braço aberto do labirinto, no grupo ptx100 ( $300,0 \pm 0,00s$ ) quando comparado com o grupo glu ( $99,43 \pm 30,46s$ ) (esquiva 1) (MW-U-  $25,00$ ,  $p < 0,003$ ),

no grupo ptx100 ( $300,0 \pm 0,00s$ ) quando comparado ao grupo glu ( $164,90 \pm 31,38s$ ) (esquiva 2) (MW-U- 40,00,  $p < 0,034$ ), ptx200 + glu ( $272,15 \pm 17,53s$ ) quando comparado ao grupo glu ( $164,90 \pm 31,38s$ ) (esquiva 2) (MW-U- 68,000,  $p < 0,048$  e para ptx100 ( $293,55 \pm 6,44s$ ) quando comparado ao glu ( $144,76 \pm 33,74 s$ ) (esquiva 3) (MW-U- 40,00,  $p < 0,034$  (Figura 26).

## 9. EFEITO DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DA ESQUIVA PASSIVA

Um ótimo aprendizado e memória foi observado no grupo tratado com pentoxifilina em animais lesados e não lesados com glutamato quando comparados aos seus respectivos treinos, exceto no grupo ptx200mg/kg (ANOVA): **ptx100-** (n- 9): treino-  $49,68 \pm 31,47s$ , memória recente-  $112,00 \pm 47,26$ , memória tardia-  $300,00 \pm 0,00$ , ( $F(2,16) = 21,381$ ,  $p < 0,0001$ ); **ptx200-** (n- 8): treino-  $133,53 \pm 43,45s$ , memória recente-  $193,43 \pm 49,45$ , memória tardia-  $164,50 \pm 47,89$ ,  $F(2,21) = 0,406$ ,  $p < 0,671$ ; **ptx50 + glu** (n-9): treino-  $116,41 \pm 33,32$ , memória recente-  $255,38 \pm 30,33$ , memória tardia-  $300 \pm 0,00$ ,  $F(2,24) = 13,55$ ,  $p < 0,0001$ ; **ptx100 + glu** (n-15): treino-  $60,83 \pm 27,49$ , memória recente-  $127,15 \pm 34,67$ , memória tardia-  $176,68 \pm 34,32$ ,  $F(2,42) = 3,233$ ,  $p < 0,0495$  e **ptx200 + glu** (n-13): treino-  $71,32 \pm 27,41$ , memória recente-  $163,48 \pm 33,89$ , memória tardia-  $221,19 \pm 35,41$ ,  $F(2,36) = 5,435$ ,  $p < 0,0087$ . Foi observada diferença significativa na latência de entrada dos animais, entre os grupos, na memória recente (Kruskal-Wallis, KW- 15,560,  $p < 0,02$ ).

Nesta condição, um dano significativo foi observado no grupo tratado com glutamato quando comparado aquele tratado com salina (salina:  $200,43 \pm 52,09s$ ; glu:  $64,58 \pm 31,92s$ ). Por outro lado, uma melhora significativa foi detectada após o tratamento com pentoxifilina na dose de 50mg/kg e 200mg/kg quando comparado ao

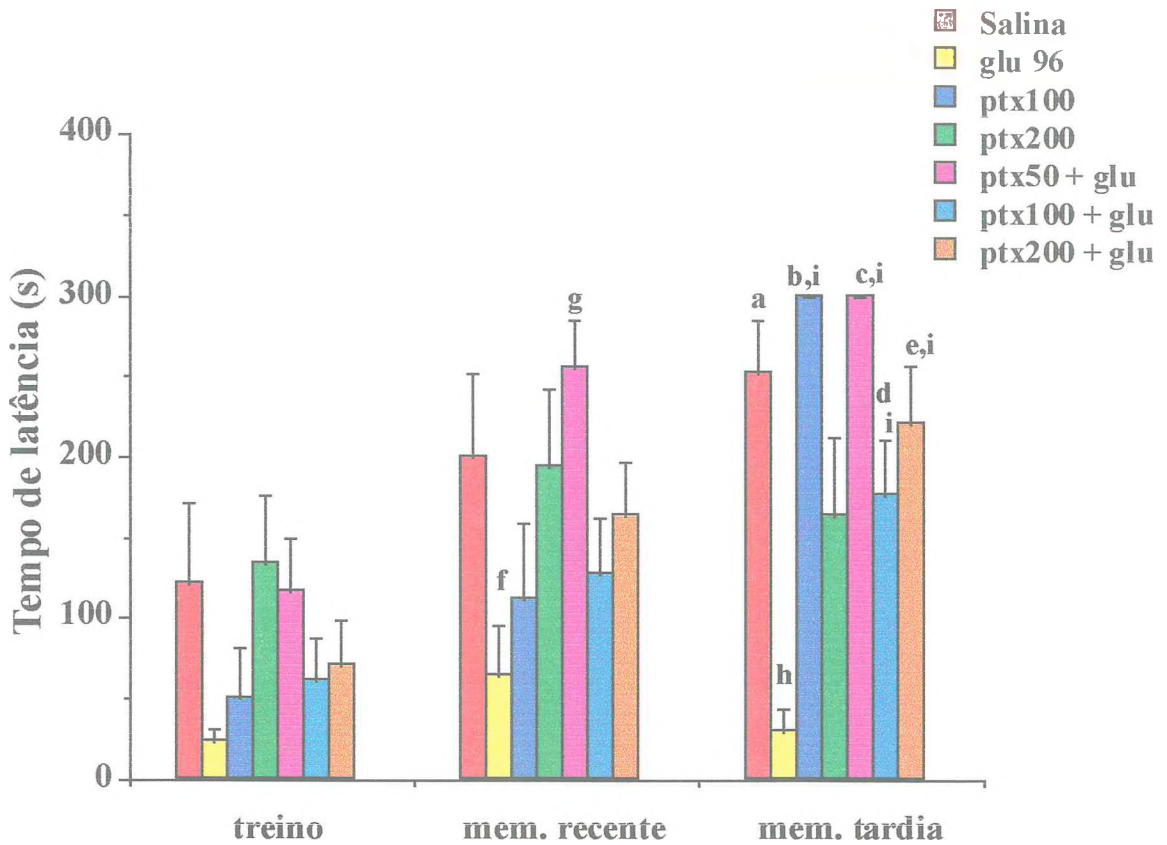


**Figura 26. Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto em T elevado.** Os animais foram lesados com glutamato (96  $\mu\text{g}/2,4 \mu\text{L}$ ) na região hipocampal e imediatamente tratados com pentoxifilina (ptx: 50, 100 ou 200 mg/kg i.p.) Os animais do grupo controle e ptx100 e 200 mg/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu\text{L}$ ) intrahipocampal. Quarenta e oito horas após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência de saída do braço fechado do aparelho. O número de animais por grupo variou de 9 a 27. a: vs salina (treino), b: vs glu (treino), c: vs pent 100 (treino), d: vs pent100 + glu (treino), e: vs pent 200 + glu (treino), f: vs glu (esquiva 1), g: vs glu (esquiva 2), h: vs glu (esquiva 3). Treinos: teste de Friedmann; Esquivas: teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney,  $p < 0,05$ .

grupo com glu (ptx50 + glu: 255,38 ± 30,36s, Mann-Whitney, U-11,00 p<0,001 e ptx200 + glu: 163,48 ± 33,89, Mann-Whitney, U-32,00 p<0,013. Na memória tardia, foi também observada uma diferença significativa entre os diversos grupos (Kruskal-Wallis, KW-35,152, p< 0,0001). Assim foi verificado, um dano na memória no grupo tratado com glutamato comparado com salina e uma melhora após o tratamento com pentoxifilina quando comparado com glutamato (salina: 252,57 ± 31,77s; glu: 29,39s ± 14,55s; ptx50 + glu: 300 ± 0,00s, Mann-Whitney, U-0,00, p<0,0001; ptx100 + glu: 176,67 ± 34,32s; ptx200 + glu: 221,19 ± 35,41s, Mann-Whitney, U-25,00, p<0,0043). Estes dados indicam que a droga foi eficaz em reverter ou proteger os animais da lesão pelo glutamato (Figura 27).

## 10. EFEITO DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO NO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

No teste do labirinto aquático observamos uma melhora significativa (ANOVA-medidas repetidas) no aprendizado após os 12 treinos, nos grupos tratados com pentoxifilina sozinha ou em associação com glutamato (96µg) (**ptx100** (n- 9): T1- 54,00 ± 0,00s; T2- 52,2 ± 1,44s; T3- 40,23 ± 6,98s; T4- 30,21 ± 7,58s; T5- 28,74 ± 8,25s; T6- 29,78 ± 7,73s; T7- 41,07 ± 6,56s; T8- 41,19 ± 6,65s; T9- 29,00 ± 7,71s; T10- 28,59 ± 6,95s; T11- 26,74 ± 7,34s; T12- 24,01 ± 6,19s,  $\chi^2(11)= 30,795$ , p< 0,0012; **ptx200** (n- 8): T1- 46,82 ± 4,01s; T2- 36,72 ± 8,51s; T3- 16,61 ± 6,13s; T4- 25,41 ± 7,17s; T5- 26,02 ± 5,97s; T6- 21,20 ± 6,78s; T7- 44,25 ± 4,94s; T8- 22,59 ± 7,79s; T9- 23,52 ± 7,07s; T10- 24,71 ± 7,39s; T11- 26,35 ± 5,98s; T12- 15,50 ± 5,19s,  $\chi^2(11)= 22,38$ , p< 0,0216; **ptx100 + glu** (n- 11): T1- 54,00 ± 0,00s; T2- 49,84 ± 2,98s; T3- 47,38 ± 10,64s; T4- 42,14 ± 4,91s; T5- 30,54 ± 6,91s; T6- 33,43 ± 6,36s; T7- 49,37 ± 3,17s; T8- 33,83 ± 7,08s; T9- 28,93 ± 7,30s; T10- 27,34 ±



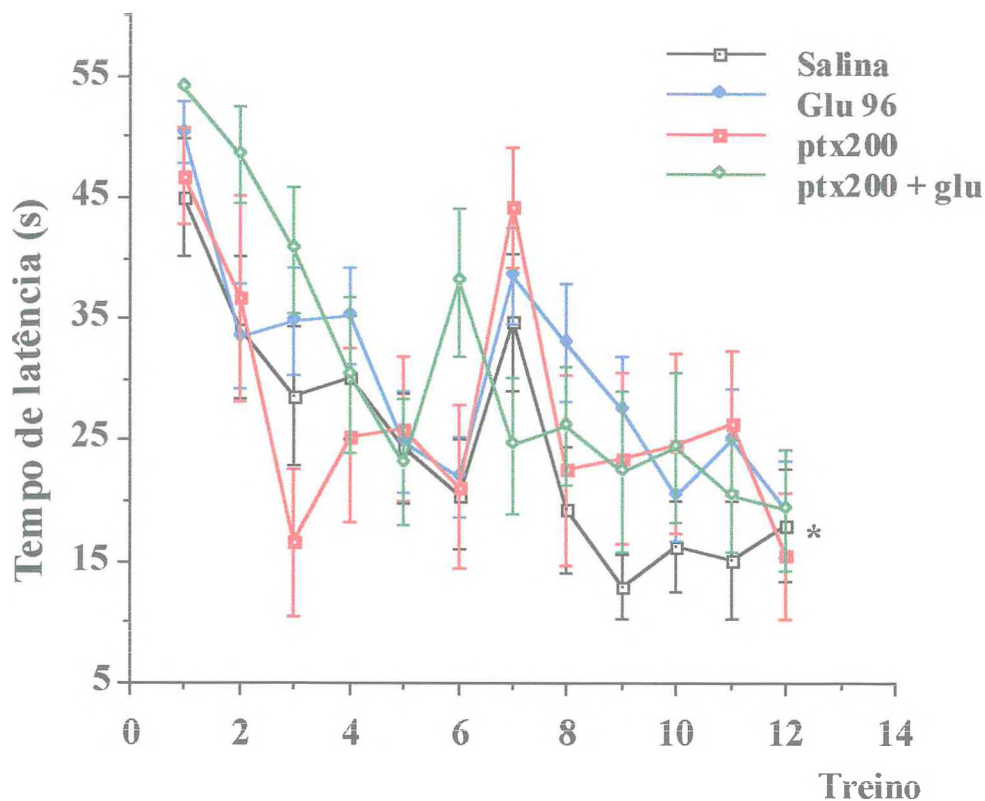
**Figura 27. Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da Esquiva Passiva .** Os animais foram lesados com glutamato (96  $\mu\text{g}/2,4 \mu\text{L}$ ) na região hipocampal e imediatamente, tratados com pentoxifilina (ptx: 50, 100 ou 200 mg/kg i.p.) Os animais do grupo controle, ptx100 e 200 mg/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu\text{L}$ ) intrahipocampal. Setenta e duas horas após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho. O número de animais por grupo variou de 6 a 21. a: a: vs salina (treino), b: ptx100 (treino), c: vs ptx50 + glu (treino), d: vs ptx100 + glu (treino), e: vs ptx200 + glu (treino), f: vs salina (memória recente), g: vs glu (memória recente), h: vs salina (memória tardia), i: vs glu (memória tardia),  $p < 0,02$ , teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney,.



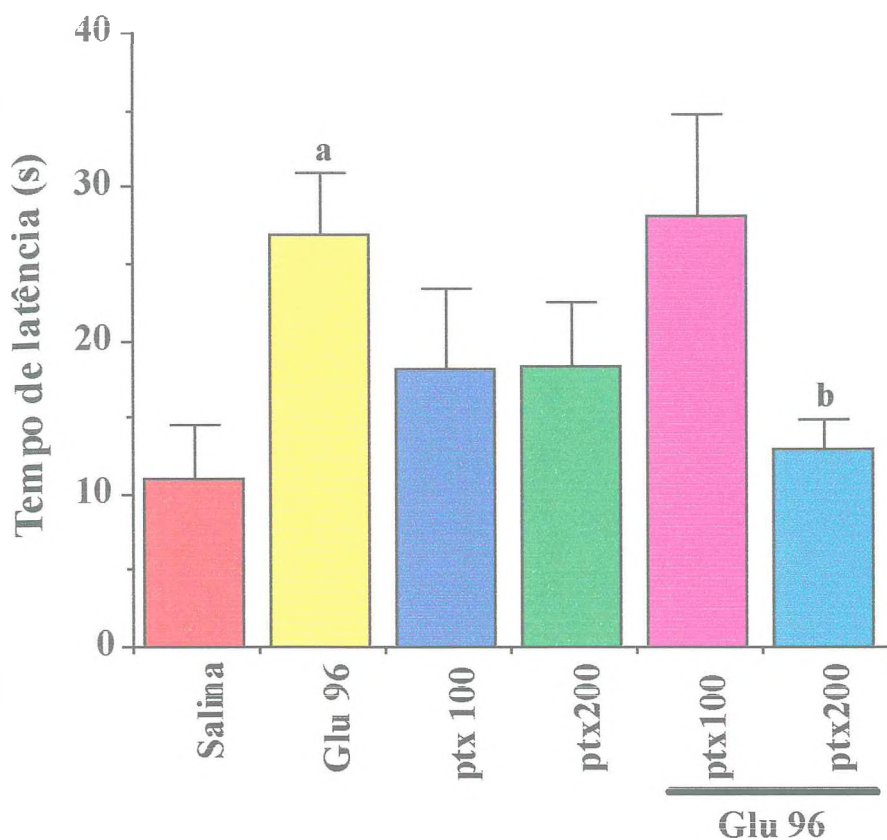
6,78s; T11- 21,86 ± 6,83s; T12- 24,67 ± 6,24s,  $\chi^2(11)= 37,5$ ,  $p < 0,0001$ , **ptx200 + glu** (n- 11):T1- 54,00 ± 0,00; T2- 48,45 ± 3,96; T3- 40,74 ± 5,19; T4- 30,38 ± 6,36; T5- 23,22 ± 5,24; T6- 38,04 ± 6,06; T7- 24,55 ± 5,54; T8- 26,17 ± 4,87; T9- 22,48 ± 6,69; T10- 24,43 ± 6,10; T11- 20,49 ± 4,58; T12- 19,31 ± 5,01,  $\chi^2(11)= 44,797$ ,  $p < 0,0001$ ). Todos os grupos apresentaram um desempenho semelhante no final dos treinos (T12,  $p > 0,05$ ) (Figura 28). Entretanto, quando a retenção do aprendizado foi testada 48 horas após o último treino, foi observada uma diferença significativa entre os grupos (Kruskal-Wallis, KW- 12,982,  $p < 0,024$ ). O tempo médio de latência para alcançar o local onde se localizava a plataforma foi: **salina**: 10,95 ± 3,56s; **glu**: 26,89 ± 3,97s; **ptx100**: 18,13 ± 5,21s; **ptx200**: 18,30 ± 4,31s; **ptx100 + glu**: 28,04 ± 6,69s.e **ptx200 + glu**: 12,96 ± 1,84s (Figura 29). Estes resultados mostram um dano significativo (Mann-Whitney,  $p < 0,04$ ) na retenção da memória observado no grupo tratado apenas com glutamato em relação ao grupo controle (salina), que foi revertido por altas doses de pentoxifilina (ptx200 + glu). Nenhuma diferença foi observada no número de travessias entre os grupos (**salina**: 11,65 ± 0,69; **glu**: 10,50 ± 1,86; **ptx100**: 9,30 ± 1,19; **ptx200**: 7,75 ± 0,82; **ptx100 + glu**: 10,10 ± 1,2; **ptx200 + glu**: 9,45 ± 1,21) (Figura 30).

## 11. AÇÃO DO GLUTAMATO E PENTOXIFILINA SOBRE OS NÍVEIS DE AMP<sub>C</sub> NO HIPOCAMPO DE RATOS

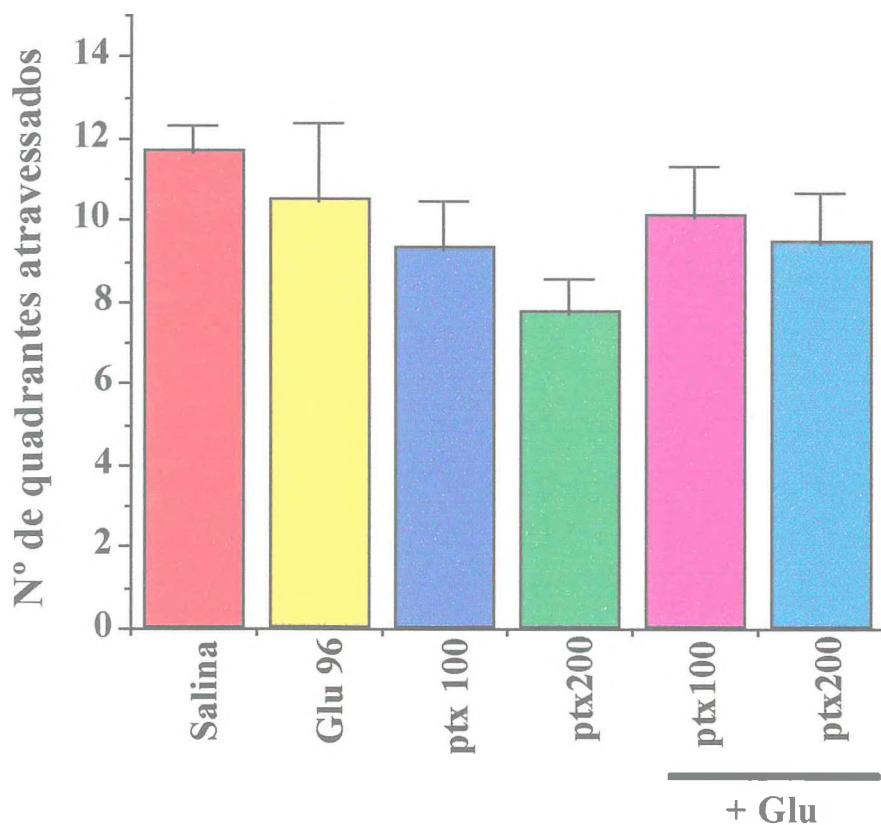
A lesão hipocampal por glutamato (96µg) reduziu significativamente os níveis de AMP<sub>C</sub> ( $p < 0,0001$ ) no hipocampo (0,1867 pmol/mg proteína) e o efeito foi revertido pelo tratamento com pentoxifilina (100 e 200 mg/kg), de uma maneira dose-dependente (0,3767 e 1,060 pmol/mg proteína, respectivamente). Na dose mais alta, os níveis de AMP<sub>C</sub> foram semelhantes ao do grupo controle ou do grupo tratado somente com pentoxifilina 100 mg/kg (0,968 e 1,170 pmol/mg de proteína, respectivamente ( $p < 0,01$ , one-way ANOVA, teste de Tukey-Kramer) (Tabela 4).



**Figura 28.** Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto aquático de Morris- Aprendizagem. Os animais foram lesados com glutamato (96  $\mu\text{g}/2,4 \mu\text{L}$ ) na região hipocampal e imediatamente tratados com pentoxifilina (ptx: 100 ou 200 mg/kg i.p.) Os animais do grupo controle e ptx100 e 200 mg/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu\text{L}$ ) na região hipocampal. Vinte e quatro horas após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência gasto pelo animais para alcançar a plataforma submersa, durante os 12 treinos a que foram submetidos. O número de animais por grupo variou de 8 a 19. \* vs Treino 1,  $p < 0,05$  (teste de Friedmann e ANOVA-medidas repetidas).



**Figura 29.** Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal com glutamato, no teste do Labirinto aquático de Morris- Retenção. Os animais foram lesados com glutamato (96  $\mu\text{g}/2,4 \mu\text{L}$ ) na região hipocampal e imediatamente após, tratados com pentoxifilina (ptx: 100 ou 200 mg/kg i.p.) Os animais do grupo controle e ptx100 e 200 mg/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu\text{L}$ ) intrahipocampal. 10 dias após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência gasto pelo animais para alcançar o local onde se encontrava a plataforma submersa, 48 horas após o último treino. O número de animais por grupo variou de 8 a 19. a vs salina, b vs Glu,  $p < 0,04$  (teste de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney).



**Figura 30. Efeito da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto aquático de Morris- Nº de quadrantes atravessados.** Os animais foram lesados com glutamato (96  $\mu\text{g}/2,4 \mu\text{L}$ ) na região hipocampal e imediatamente tratados com pentoxifilina (ptx: 100 ou 200 mg/kg i.p.) Os animais do grupo controle e ptx100 e 200 mg/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu\text{L}$ ) intrahipocampal. 10 dias após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do número de quadrantes atravessados pelos animais em 1 minuto, realizado 48 horas após o último treino. O número de animais por grupo variou de 8 a 19.

**Tabela 4. Concentração de AMP<sub>c</sub> em homogenato de hipocampo de ratos lesados com glutamato e tratados com pentoxifilina**

Tratamento	Dose	AMP <sub>c</sub> (pmol/mg proteína)
Salina	----	0,968 ± 0,19
Glutamato	96µg	0,186 ± 0,09 <sup>a</sup>
Pentoxifilina	100mg/kg	1,170 ± 0,17
Ptx + Glu	100mg/kg + 96µg	0,376 ± 0,08
	200mg/kg + 96µg	1,060 ± 0,19 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos com média ± EPM. A pentoxifilina foi administrada intraperitonealmente em ratos durante 6 dias, imediatamente após a lesão hipocampal induzida por glutamato e sacrificados após uma semana. <sup>a</sup> vs salina, <sup>b</sup> vs glutamato (p<0,01, ANOVA e teste de Tukey-Kramer).

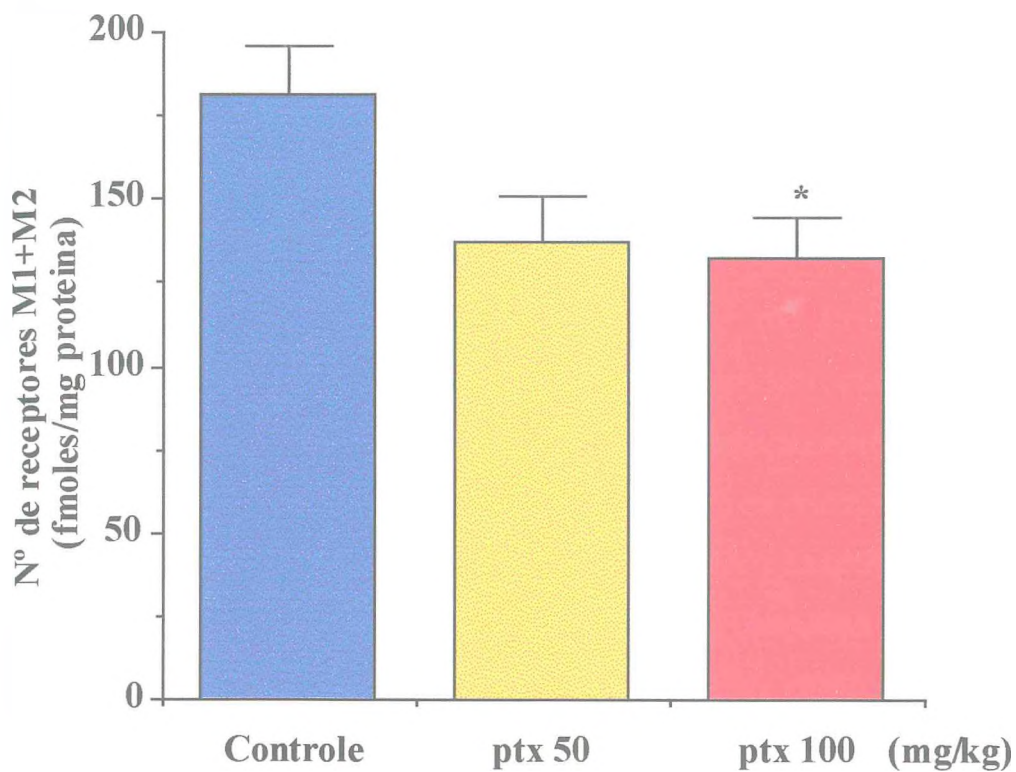
## 12. AÇÃO DO GLUTAMATO E DA PENTOXIFILINA SOBRE O NÚMERO DE RECEPTORES MUSCARÍNICOS (M1 + M2) NO HOMOGENATO DE HIPOCAMPO DE RATOS

Os animais foram sacrificados uma semana após o tratamento com pentoxifilina para a determinação do número de receptores muscarínicos pela técnica de *binding*. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, apesar de notarmos uma tendência à diminuição após lesão com glutamato (**salina** (n-4):  $241,45 \pm 11,68$ ; **glu96** (n-8):  $217,63 \pm 27,56$  fmoles/mg de proteína) e um retorno aos níveis normais após tratamento com pentoxifilina (100mg/kg) (**ptx + glu** (n-6):  $255,51 \pm 29,47$  fmoles/mg de proteína). O número de receptores, embora não significativo, foi maior nos animais não lesados e tratados com pentoxifilina (**ptx** (n-5):  $283,58 \pm 50,02$  fmoles/mg de proteína (Tabela 5). Em outro grupo de experimentos os animais (n-6) não foram submetidos à estereotaxia e lesão com glutamato, somente ao tratamento com pentoxifilina (50 e 100mg/kg) durante seis dias e sacrificados 15 minutos após o último tratamento, nesta condição experimental foi observado uma diminuição significativa (ANOVA- F(2,14)- 3,879) no número de receptores (**salina**:  $181,71 \pm 14,28$ ; **ptx50**:  $137,50 \pm 13,77$ ; **ptx100**:  $132,74 \pm 11,80$  fmoles/mg de proteína,  $p < 0,05$ , teste de Tukey-Kramer), provavelmente por *downregulation*, o que não foi observado nos animais do grupo anterior, que foram lesados e não estavam mais sob a influência do tratamento com pentoxifilina (Figura 31).

**Tabela 5. Efeito do glutamato e pentoxifilina sobre o número de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenato de hipocampo de ratos**

Tratamento	3H-NMS <i>binding</i> (fmol/mg de proteína)
Salina	241,45 ± 11,68 (4)
Glutamato 96µg	217,63 ± 27,56 (8)
Pentoxifilina 100mg/kg + Glu96µg	255,51 ± 29,47 (6)
Pentoxifilina 100mg/kg	283,58 ± 50,02 (5)

Os animais foram lesados com glutamato (96 µg/2,4 µL) na região hipocampal e imediatamente tratados com pentoxifilina (ptx: 100mg/kg, i.p.) durante 6 dias e sacrificados 7 dias após o tratamento. Os animais do grupo salina e ptx100mg/kg foram injetados com salina (2,4 µL) na região hipocampal. Os resultados estão expressos com média ± EPM. Os números em parênteses representam o número de animais por grupo.



**Figura 31. Ação da pentoxifilina sobre o número de receptores muscarínicos (M1 + M2) em homogenato de hipocampo de rato.** A pentoxifilina foi administrada intraperitonealmente em ratos durante 6 dias e estes sacrificados 15 minutos após o tratamento. Os resultados estão expressos com média  $\pm$  EPM (n-6). \* vs salina ( $p < 0,05$ , ANOVA e teste de Tukey-Kramer)

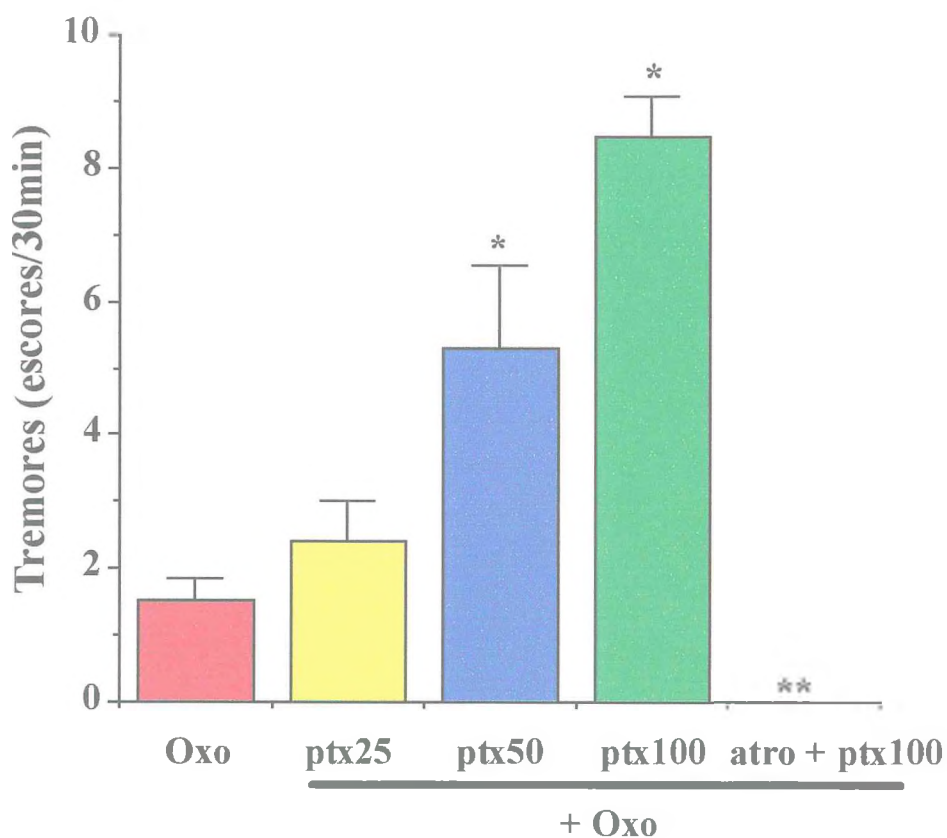


### 13. A PENTOXIFILINA POTENCIA OS TREMORES INDUZIDOS PELA OXOTREMORINA EM CAMUNDONGOS

A figura 32 mostra os efeitos da pentoxifilina (ptx- 25, 50 e 100mg/kg, i.p.) nos tremores induzidos pela oxotremorina (oxo 0,3mg/kg). A oxo (n-15) induziu leves tremores com uma média de escores em 30 minutos de  $1,53 \pm 0,34$  tremores, a ptx potenciou a intensidade dos tremores induzidos pela oxo de uma maneira dose dependente, como demonstrado pelo aumento do número de escores (Kruskal-Wallis, KW-47,346,  $p < 0,0001$ ) (oxo (n-15):  $1,53 \pm 0,33$ ; ptx25 + oxo (n-10):  $2,40 \pm 0,62$ ; ptx50 + oxo (n-10):  $5,30 \pm 1,23$ ; ptx100 + oxo (n-19):  $8,47 \pm 0,61$  escores/30min),  $p < 0,01$ , ptx 50 e 100 + oxo vs oxo, Mann-Whitney. Em outro grupo de experimentos foi feito um tratamento prévio com atropina (10mg/kg, i.p.), para bloquear os efeitos da ptx, neste caso foram observados uma inibição completa dos tremores, evidenciando um efeito muscarínico central da ptx (atropina + ptx100 + oxo-  $0,00 \pm 0,00$  escores/30min) ( $p < 0,001$ , ptx100 + oxo vs atropina + ptx100 + oxo, teste de Mann-Whitney).

### 14. EFEITO DO GLUTAMATO E DA PENTOXIFILINA SOBRE A FORMAÇÃO DE MALONILDIALDEÍDO EM HOMOGENATO DE HIPOCAMPO DE RATO

Não foi detectada diferença na formação de peróxidos lipídicos, nos animais lesados com glutamato e tratados com pentoxifilina na dose de 100mg/kg (salina (n-4) -  $27,01 \pm 2,13$ ; glu 96 $\mu$ g (n-5)-  $24,19 \pm 2,76$ ; ptx100 + glu (n-5)-  $27,74 \pm 0,74$ ; ptx100 (n-5)-  $27,75 \pm 2,10$  nmoles/g de tecido) (Tabela 6).



**Figura 32. A pentoxifilina potencia os tremores induzidos pela oxotremorina em camundongos.** Os animais foram tratados com pentoxifilina (ptx) nas doses de 25, 50 e 100mg/kg, i.p., 30 minutos antes da injeção de oxotremorina (oxo) (0,3mg/kg), após 30 min foram contados o número de tremores em intervalos de 5min, durante 30 min, que foram medidos numa escala de escores (ver Material e Métodos). Um grupo de animais foi tratado com atropina (atro)(10mg/kg, i.p.) 15 min antes da injeção de oxotremorina. Os números representam média  $\pm$  EPM do número de escores obtidos pelos animais no intervalo de 30min. \* vs oxo,  $p < 0,01$ , \*\* vs ptx100 + oxo,  $p < 0,001$  (teste de Mann-Whitney).

**Tabela 6. Efeitos do glutamato e da pentoxifilina sobre a formação de malonildialdeído em homogenato de hipocampo de rato**

<b>Tratamento</b>	<b>Malonildialdeído (nmoles/g de tecido)</b>
Salina	27,01 ± 2,13 (4)
Glutamato 96µg	24,19 ± 2,76 (5)
Pentoxifilina 100mg/kg + Glu96µg	27,74 ± 0,74 (5)
Pentoxifilina 100mg/kg	27,75 ± 2,10 (5)

Os resultados estão expressos como média ± EPM. A pentoxifilina foi administrada intraperitonealmente em ratos durante 6 dias, imediatamente após a lesão hipocampal com glutamato e sacrificados 7 dias após o fim do tratamento. Em parênteses, o número de animais por grupo.

## 15. EFEITOS DO GLUTAMATO E PENTOXIFILINA SOBRE A PRODUÇÃO DE NITRITO/NITRATO EM HOMOGENATO DE HIPOCAMPO DE RATOS

Observamos um aumento nos níveis de nitrito/nitrato nos animais lesados com glutamato e uma reversão aos níveis do controle após o tratamento com pentoxifilina (salina (n-5)-  $5,24 \pm 0,82$ ; glu96 (n-8)-  $9,22 \pm 1,20$ ; ptx100 + glu96 (n-9) -  $5,98 \pm 0,46$ ; ptx100 (n-4)-  $4,72 \pm 0,36\mu\text{M}$ ,  $p < 0,05$ , ANOVA e Tukey-Kramer) (Tabela 7). Os resultados demonstram que o glutamato e a pentoxifilina estimula e inibe, respectivamente a formação de nitrito/nitrato.

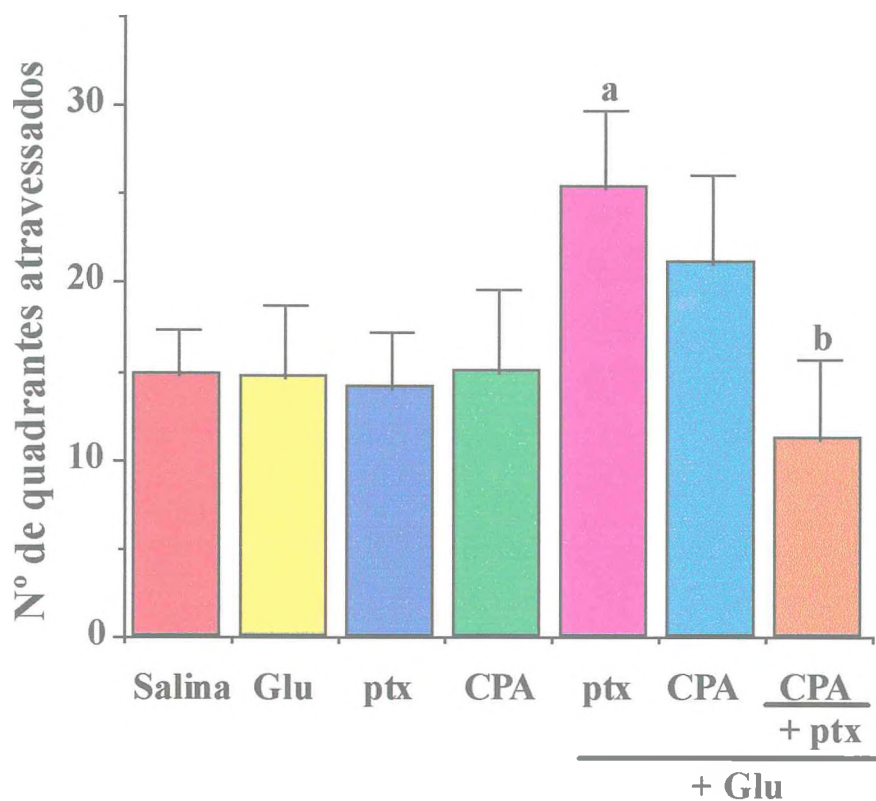
## 16. A CICLOPENTILADENOSINA (CPA) INIBE OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL POR GLUTAMATO, NO TESTE DO CAMPO ABERTO

A ptx (100mg/kg) aumentou a atividade locomotora dos animais lesados com glutamato e o tratamento prévio com CPA na dose de  $100\mu\text{g}/\text{kg}$ , conseguiu reverter estes efeitos, mas não significativamente (Mann-Whitney,  $p < 0,06$ ) quando observados pelo número de quadrantes atravessados pelos animais (salina (n- 17)-  $14,82 \pm 2,98$ ; glu96 (n- 16):  $14,63 \pm 4,04$ ; ptx100 + salina (n- 9):  $14,00 \pm 3,24$ ; ptx100 + glu (n- 10):  $25,40 \pm 4,27$ ; CPA100 + salina (5)-  $15,00 \pm 4,67$ ; CPA100 + ptx + glu (10)-  $11,10 \pm 4,64$ ; CPA100 + glu (9)-  $21,11 \pm 4,93$  quadrantes) (Figura 33).

**Tabela 7. Efeitos do glutamato e da pentoxifilina sobre a produção de nitrito/nitrato em homogenato de hipocampo de ratos**

Tratamento	Nitrito/nitrato ( $\mu\text{M}$ )
Salina	$5,24 \pm 0,82$ (5)
Glutamato 96 $\mu\text{g}$	$9,22 \pm 1,20$ (8) <sup>a</sup>
Pentoxifilina 100mg/kg + Glu96 $\mu\text{g}$	$5,98 \pm 0,46$ (9) <sup>b</sup>
Pentoxifilina 100mg/kg	$4,72 \pm 0,36$ (4)

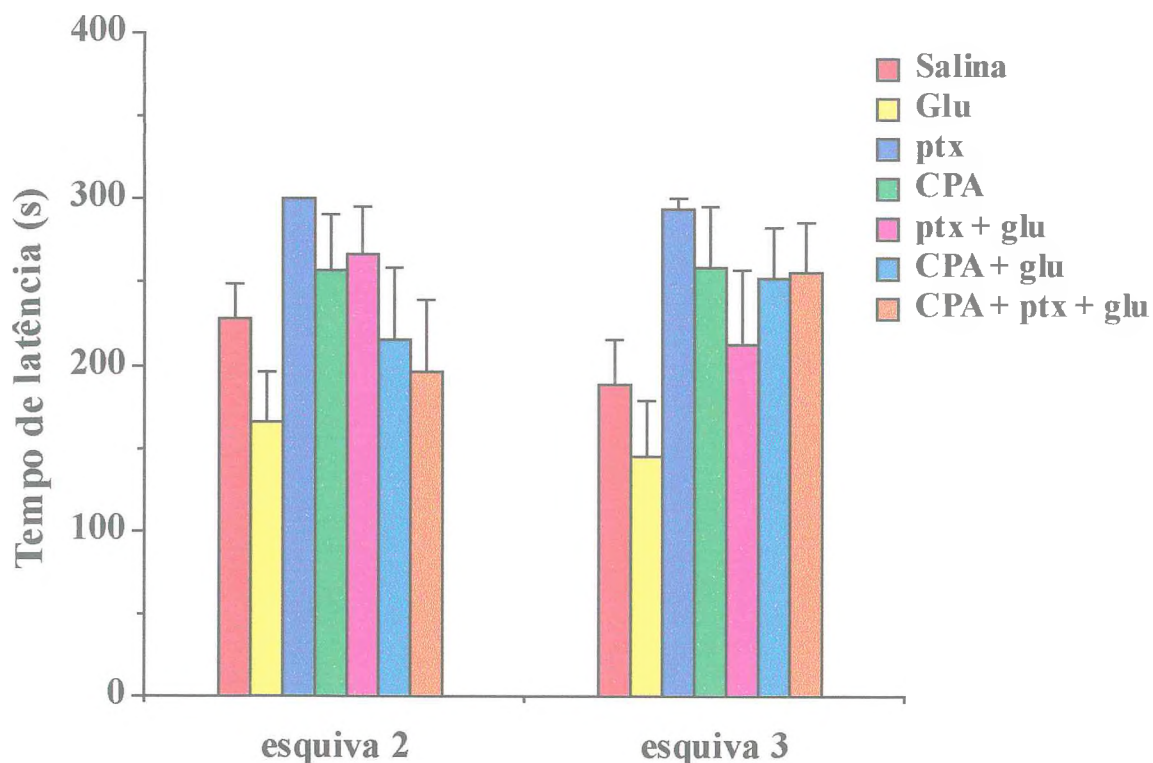
Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM. A pentoxifilina foi administrada intraperitonealmente em ratos durante 6 dias, imediatamente após a lesão hipocampal com glutamato e sacrificados 7 dias após o fim do tratamento. Os números em parênteses representam o número de animais por grupo.<sup>a</sup> vs salina, <sup>b</sup> vs glutamato ( $p < 0,05$ , ANOVA, teste de Tukey-Kramer)



**Figura 33.** A ciclopentiladenosina (CPA) reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do campo aberto. Os animais foram injetados com CPA 100µg/kg, i.p., 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) em seguida lesados com glutamato (96 µg/2,4 µL) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, CPA100, e ptx100 foram injetados com salina (2,4 µL) intrahipocampal. Sete dias após o tratamento foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de quadrantes atravessados pelo animal em 3 minutos. O número de animais por grupo variou de 9 a 16. a vs glu, b vs ptx + glu,  $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney.

## 17. A CICLOPENTILADENOSINA (CPA) NÃO REVERTE OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL COM GLUTAMATO, NO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO

Como demonstrado anteriormente, a pentoxifilina (ptx) protegeu os animais lesados com glutamato dos déficits de memória induzidos pelo glutamato neste teste. Com o objetivo de estudar o mecanismo desta ação resolvemos investigar uma possível ação a nível do receptor da adenosina (A1), já que está demonstrado ser a ptx um antagonista deste receptor. Usamos um agonista do receptor da adenosina do subtipo A1, a ciclopentiladenosina (CPA), 15 minutos antes do tratamento com ptx (100mg/kg, i.p., dose única), e após este período o animal foi submetido à lesão intrahipocampal com glutamato. Uma semana após a cirurgia foram realizados os testes de memória. Observamos que a CPA 100µg/kg, i.p. não reverteu significativamente os efeitos da ptx, apesar de diminuir seu efeito, na esquiua 2, além de mostrar uma ação *per si* protegendo os animais dos déficits de memória, resultados porém não significativos, quando observados na esquiua 2 (**salina** (n- 27): 227,57 ± 22,09s; **glu96** (n- 18): 164,90 ± 31,38s; **ptx100** (n- 9): 300,00 ± 0,00s; **ptx100 + glu** (n- 10): 266,00 ± 28,85s; **CPA100 + ptx + glu** (10): 196,45 ± 42,82s; **CPA100 + glu** (9): 215,72 ± 43,09s, **CPA100 + salina** (7): 266,00 ± 33,29s) quanto na esquiua 3 (**salina** (n- 27): 188,12 ± 26,66s; **glu96** (n- 18): 144,76 ± 33,73s; **ptx100 + glu** (n- 10): 212,79 ± 44,41s; **CPA100 + ptx + glu** (10): 256,00 ± 29,41s; **CPA100 + glu** (9): 252,44 ± 30,15s; **CPA100 + salina** (7): 258,14 ± 38,01s) (Figura 34).



**Figura 34.** A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto em T elevado. Os animais foram injetados com CPA 100 $\mu$ g/kg, i.p., 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) e em seguida lesados com glutamato (96  $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, ptx100 e CPA 100 $\mu$ g/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu$ L) intrahipocampal. Oito dias após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência de saída do braço fechado do aparelho. O número de animais por grupo variou de 7 a 27.

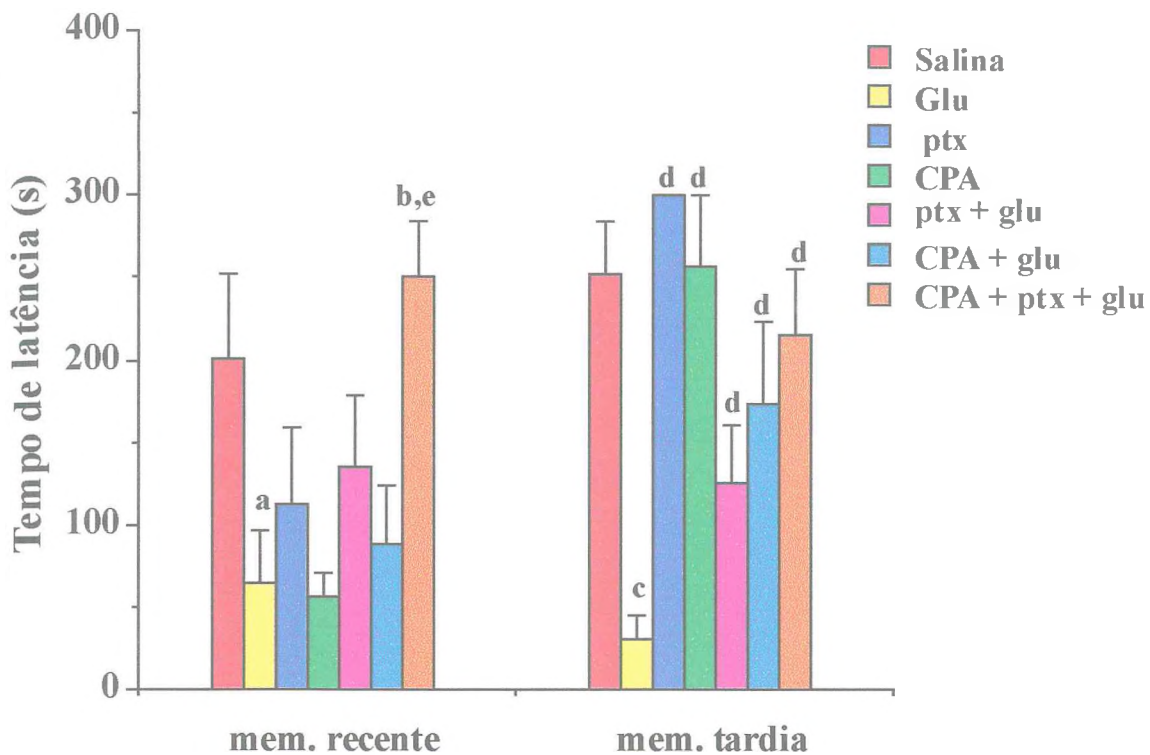


## 18. A CICLOPENTILADENOSINA (CPA) NÃO REVERTE OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL COM GLUTAMATO, NO TESTE DA ESQUIVA PASSIVA

Também neste teste não foi observado uma inibição pela CPA dos efeitos da pentoxifilina (ptx), ao contrário, este efeito foi aumentado, na memória recente (**salina** (n- 7):  $200,43 \pm 52,09s$ ; **glu96** (n- 12):  $64,58 \pm 31,92s$ ; **ptx100** (n- 9):  $112,00 \pm 47,29s$ ; **ptx100 + glu** (n- 10):  $134,50 \pm 43,89s$ ; **CPA100 + ptx + glu** (10):  $250,57 \pm 33,44s$ ; **CPA100 + glu** (9):  $88,74 \pm 35,59s$ ; **CPA100 + salina** (7):  $56,47 \pm 13,98$ ) (ptx100 + glu vs CPA + ptx100 + glu, Mann-Whitney, MW-23,00,  $p < 0,04$ ). Além disso a CPA mostrou um efeito protetor significativo (Mann-Whitney, MW-24,00,  $p < 0,034$ ) contra os danos na retenção da memória nos animais lesados pelo glutamato, observados na memória tardia (**salina** (n- 7):  $252,57 \pm 31,78s$ ; **glu96** (n- 12):  $29,92 \pm 14,54s$ ; **ptx100** (n- 9):  $300,00 \pm 0,00s$ ; **ptx100 + glu** (n- 12):  $125,25 \pm 36,11s$ ; **CPA100 + ptx + glu** (10):  $214,87 \pm 40,04s$ ; **CPA100 + glu** (9):  $174,26 \pm 49,72s$ ; **CPA100 + salina** (7):  $257,40 \pm 42,60$ ) (Figura 35).

## 19. A CICLOPENTILADENOSINA (CPA) NÃO REVERTE OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Neste teste, a ptx na dose de 100mg/kg não conseguiu reverter o dano na aquisição da memória induzido pelo glutamato, como nos outros testes a CPA estava mostrando um efeito de melhorar os danos de memória, usamos esta dose para observarmos um efeito potenciador ou aditivo. Observamos que a CPA (100 $\mu$ g/kg, i.p.) não conseguiu aumentar o efeito da ptx e também não demonstrou um efeito *per si*, quando observamos a retenção da memória 48 horas após o treinamento (**salina** (n- 14):  $10,95 \pm 3,56s$ ; **glu96** (n- 19):  $26,89 \pm 3,97s$ ; **ptx100** (n- 9):  $23,13 \pm 6,38s$ ; **ptx100 + glu** (n- 10):  $29,54 \pm 6,93s$ ; **CPA100 + ptx + glu** (10):  $26,95 \pm 6,13s$



**Figura 35. Ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da Esquiva Passiva.** Os animais foram injetados com CPA 100 $\mu$ g/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) e em seguida lesados com glutamato (96  $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, ptx100 e CPA100 $\mu$ g/kg foram injetados com salina (2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Nove dias após o tratamento foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho. O número de animais por grupo variou de 7 a 12. a vs salina (mem. recente), b vs glu (mem. recente), c vs salina (mem. tardia), d vs glu (mem. tardia), e vs ptx + glu (mem. recente),  $p < 0,03$ , teste de Mann-Whitney.

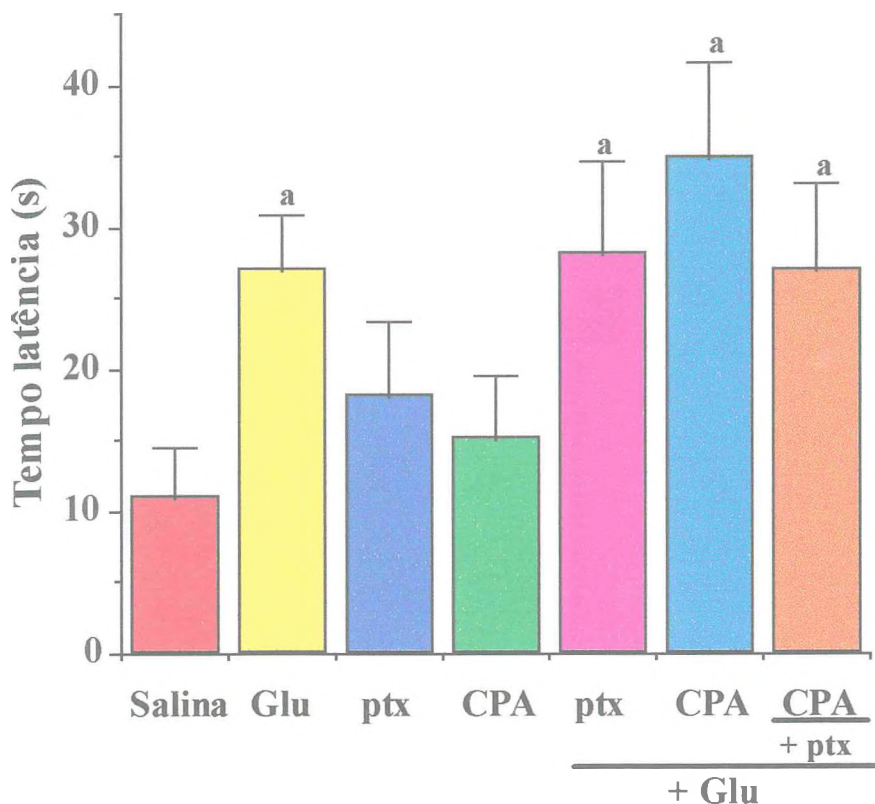
**CPA100 + glu (6)-**  $34,85 \pm 6,77s$ ; **CPA100 + salina (5)-**  $15,00 \pm 4,67s$  (Figura 36).

## **20. A TALIDOMIDA NÃO POTENCIA OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DO CAMPO ABERTO**

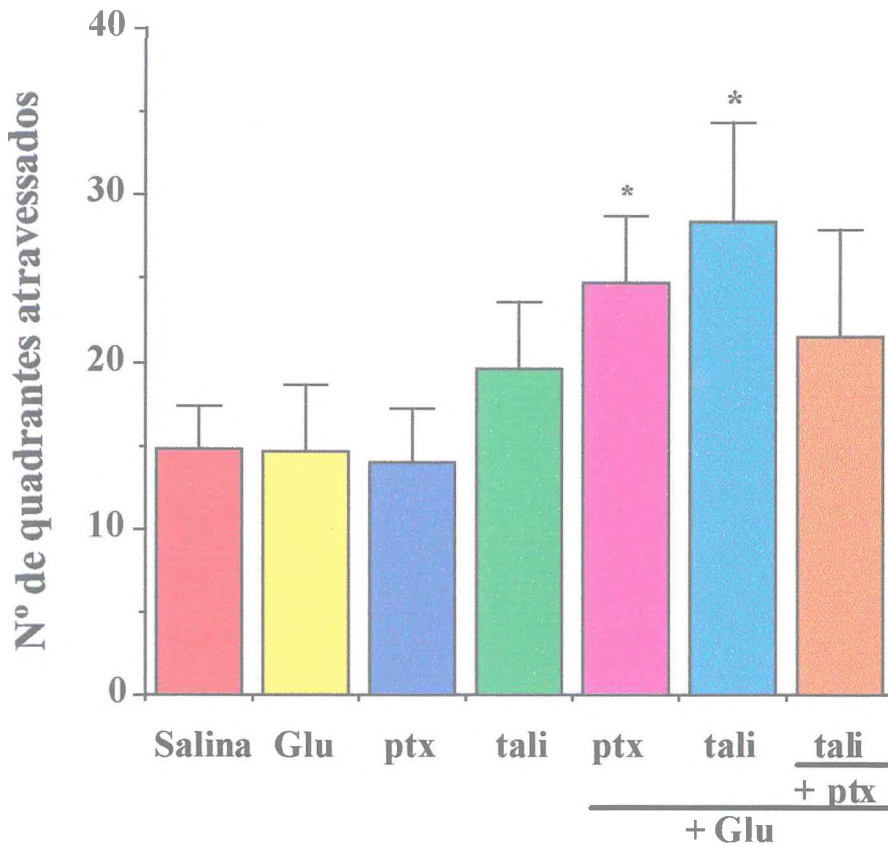
A talidomida (tali) (10mg/kg, i.p.) foi usada neste grupo de experimentos com o objetivo de investigar o mecanismo de ação da ptx, a talidomida é um inibidor da síntese de TNF- $\alpha$  e como a ptx também atua na inibição da síntese desta citocina pró-inflamatória. Neste experimento foi investigada uma possível ação potenciadora da ação da ptx neste modelo de atividade locomotora. A ptx (100mg/kg) aumentou a atividade locomotora dos animais lesados com glutamato e o tratamento prévio com tali na dose de 10mg/kg, não potenciou os efeitos da ptx, quando observados pelo número de quadrantes atravessados pelos animais, mas demonstrou uma ação idêntica à ptx, aumentando a atividade locomotora quando comparados com o grupo tratado com glutamato (Mann-Whitney U- 37,500,  $p < 0,04$ ) (**salina** (n- 17):  $14,82 \pm 2,59$ ; **glu96** (n- 16):  $14,63 \pm 4,04$ ; **ptx100 + glu** (n- 16):  $24,81 \pm 4,00$ ; **tali10 + salina** (7):  $19,57 \pm 3,99$ ; **tali10 + ptx + glu** (9):  $21,56 \pm 6,47$ ; **tali10 + glu** (10):  $28,50 \pm 5,95$  quadrantes) (Figura 37).

## **21. A TALIDOMIDA REVERTE OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DO LABIRINTO EM T ELEVADO**

Como demonstrado anteriormente, a pentoxifilina (ptx) protegeu os animais lesados com glutamato dos déficits de memória induzidos pelo glutamato neste teste. Observamos que a talidomida (10mg/kg) (tali10 + ptx + glu) reverteu os efeitos da ptx, na esquiwa 3, comparando-se com o grupo ptx + glu (teste de Mann-Whitney,



**Figura 36.** A ciclopentiladenosina (CPA) não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto Aquático de Morris- Retenção. Os animais foram injetados com CPA 100 $\mu$ g/kg, i.p. 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) e em seguida lesados com glutamato (96  $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, ptx100 e CPA 100 foram injetados com salina (2,4  $\mu$ L) intrahipocampal. Dez dias após o tratamento foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo gasto pelo animal para encontrar o local onde estava a plataforma submersa. O número de animais por grupo variou de 6 a 21. a vs salina,  $p < 0,03$ , teste de Mann-Whitney.



**Figura 37.** A talidomida não potencia os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do campo aberto. Os animais foram injetados com talidomida (tali) 10µg/kg, i.p., 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) e em seguida lesados com glutamato (96 µg/2,4 µL) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, tali10, e ptx100 foram injetados com salina (2,4 µL) na região hipocampal. Sete dias após o tratamento foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de quadrantes atravessados pelo animal em 3 minutos. O número de animais por grupo variou de 7 a 16. \* vs glu, p<0,04 (teste de Mann-Whitney)

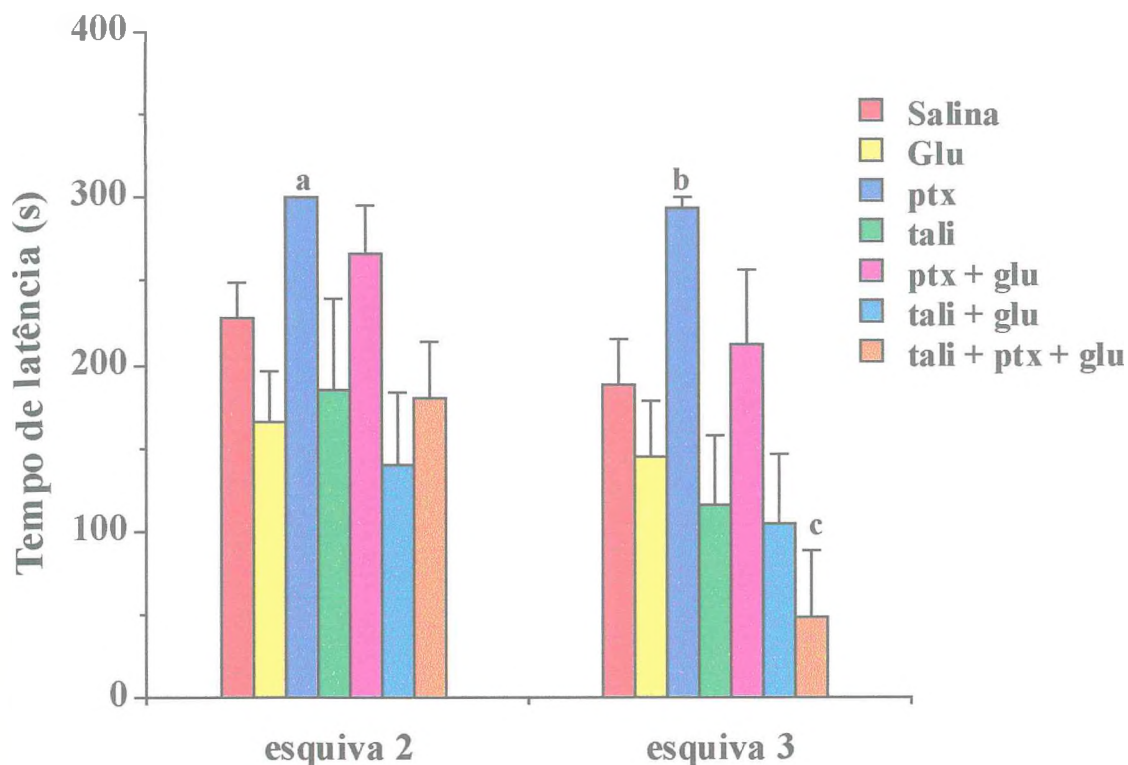
Mann-Whitney, MW-18,50,  $p < 0,028$ ), (Esquiva 2- **salina** (n- 27):  $227,57 \pm 22,09s$ ; **glu96** (n- 18):  $164,90 \pm 31,38s$ ; **ptx100 + glu** (n- 10):  $266,00 \pm 28,85s$ ; **tali10 + ptx + glu(9)**:  $180,11 \pm 47,75s$ ; **tali10 + glu** (9):  $139,30 \pm 44,43s$ ; **tali10 + salina** (7):  $185,14 \pm 54,18s$ ; Esquiva 3 (**salina** (n- 27):  $188,12 \pm 26,66s$ ; **glu96** (n- 18):  $144,76 \pm 33,73s$ ; **ptx100 + glu** (n- 10):  $212,79 \pm 44,41s$ ; **tali10 + ptx + glu** (9):  $47,74 \pm 31,98s$ ; **tali10 + glu** (10):  $104,08 \pm 42,84s$ ; **tali10 + salina** (7):  $115,29 \pm 41,62s$ ) (Figura 38).

## 22. A TALIDOMIDA NÃO REVERTE OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DA ESQUIVA PASSIVA

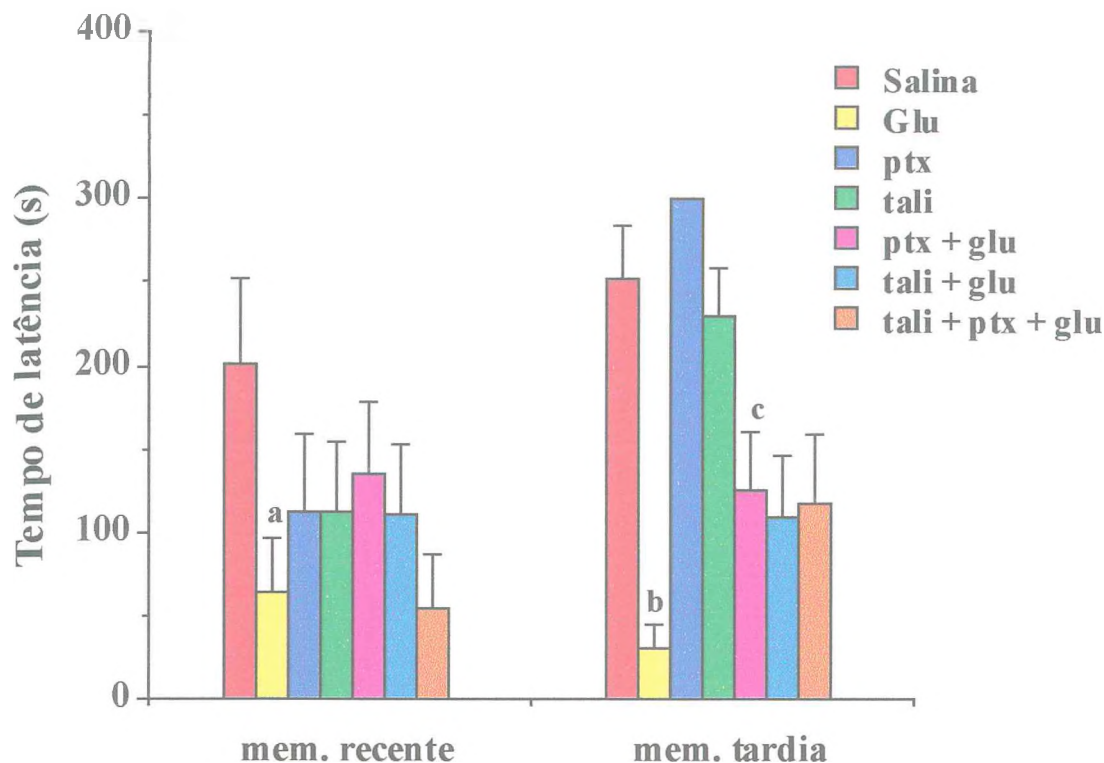
Também neste teste foi observado uma inibição não significativa, pela talidomida (tali), dos efeitos da pentoxifilina (ptx), na memória recente (**salina** (n- 7):  $200,43 \pm 52,09s$ ; **glu96** (n- 12):  $64,58 \pm 31,92s$ ; **ptx100 + glu** (n- 10):  $134,50 \pm 43,89s$ ; **tali10 + ptx + glu** (9):  $55,06 \pm 31,49s$ ; **tali10 + glu** (10):  $110,81 \pm 42,49s$ ; **tali10 + salina** (8):  $111,88 \pm 42,41s$ , não demonstrando efeito na memória tardia (**salina** (n- 7):  $252,57 \pm 31,78s$ ; **glu96** (n- 12):  $29,92 \pm 14,54s$ ; **ptx100 + glu** (n- 12):  $125,25 \pm 36,11s$ ; **tali10 + ptx + glu** (9):  $117,90 \pm 40,79s$ ; **tali10 + glu** (10):  $109,06 \pm 36,76s$ ); **tali10 + salina** (8):  $229,13 \pm 30,15s$ ) (Figura 39).

## 23. A TALIDOMIDA NÃO POTENCIA OS EFEITOS DA PENTOXIFILINA EM RATOS COM LESÃO HIPOCAMPAL INDUZIDA POR GLUTAMATO, NO TESTE DO LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Neste teste, a ptx usada na dose de 100mg/kg não conseguiu reverter o dano na aquisição da memória induzido pelo glutamato. Resolvemos então usar a talidomida uma droga que à semelhança da ptx é um inibidor da produção de TNF- $\alpha$ , a fim de observarmos um efeito de potencialização ou de adição. Observamos que



**Figura 38. A talidomida reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto em T elevado.** Os animais foram injetados com talidomida (tali) 10 $\mu$ g/kg, i.p., 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) e em seguida lesados com glutamato (96  $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, tali10, e ptx100 foram injetados com salina (2,4  $\mu$ L) intrahipocampal. Oito dias após o tratamento foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo de latência de saída do braço fechado do aparelho. O número de animais por grupo variou de 7 a 27., a vs glu (esquiva 2), b vs glu (esquiva 3), c vs ptx + glu (esquiva 3),  $p < 0,02$ , teste de Mann-Whitney.



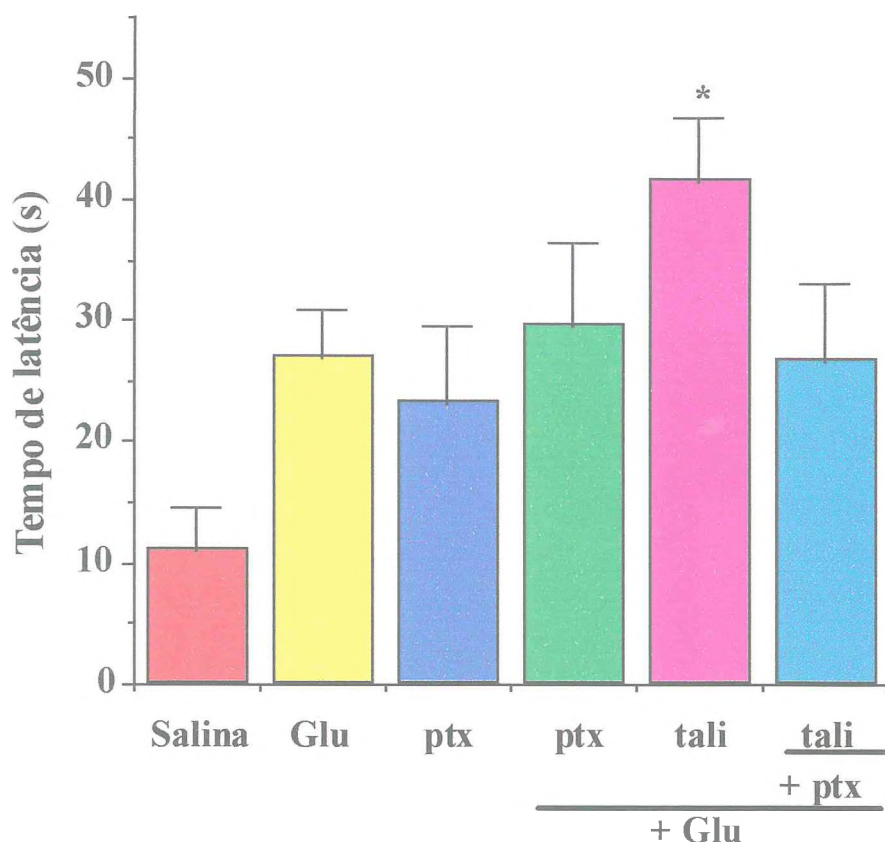
**Figura 39.** A talidomida não reverte os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste da esQUIVA passiva. Os animais foram injetados com talidomida (tali 10mg/kg, i.p.). 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p. e em seguida lesados com glutamato (96 µg/2,4 µL) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, ptx100 e tali10mg/kg foram injetados com salina (2,4 µL) intrahipocampal. Nove dias após o tratamento foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média ± EPM do tempo de latência de entrada no lado escuro do aparelho. O número de animais por grupo variou de 7 a 12. a vs salina (memória recente), b vs salina (memória tardia), c vs glu (memória tardia),  $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney.



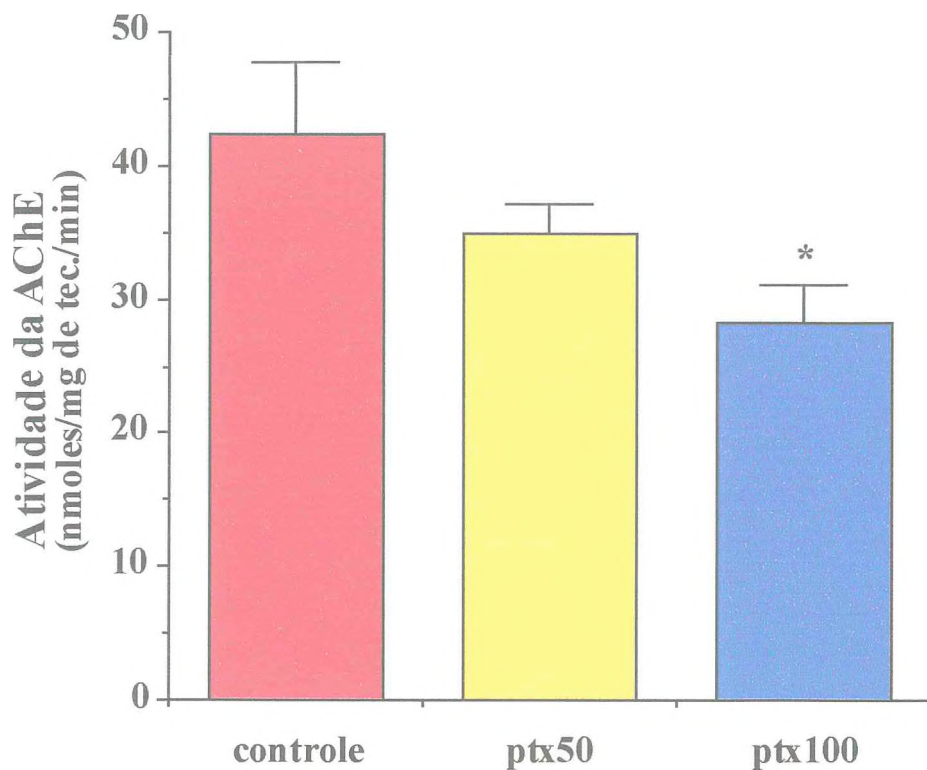
a talidomida não conseguiu aumentar o efeito da ptx e também demonstrou um efeito *per si*, quando observamos a retenção da memória 48 horas após o treinamento (**salina** (n- 14):  $10,95 \pm 3,56s$ ; **glu96** (n- 19):  $26,89 \pm 3,97s$ ; **ptx100** (n- 9):  $23,13 \pm 6,38s$ ; **ptx100 + glu** (n- 10):  $29,54 \pm 6,93s$ ; **tali10 + ptx + glu** (9):  $26,74 \pm 6,41s$ ; **tali10 + glu** (10):  $41,44 \pm 5,45s$  (Figura 40).

## 24. INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA ACETILCOLINESTERASE PELA PENTOXIFILINA *in vitro*

A pentoxifilina (ptx) na concentração de 50 e 100  $\mu M$  inibiu a atividade da acetilcolinesterase, de maneira dose-dependente (18 e 33% respectivamente), quando incubada na presença de homogenato de hipocampo de rato (**controle** (n-8):  $42,38 \pm 5,37$ , **ptx50** (n-5):  $34,99 \pm 2,16$ , **ptx100** (n-10):  $28,39 \pm 2,72$  nmoles/mg de tecido/min) (ANOVA, F(2,20)- 3,66,  $p < 0,04$  e teste de Tukey-Kramer,  $p < 0,05$  controle vs glu100) (Figura 41).



**Figura 40. A talidomida não potencia os efeitos da pentoxifilina em ratos com lesão hipocampal induzida por glutamato, no teste do Labirinto Aquático de Morris-Retenção.** Os animais foram injetados com talidomida 10mg/kg, i.p. 15 minutos antes do tratamento com pentoxifilina (ptx 100mg/kg, i.p.) e em seguida, lesados com glutamato (96  $\mu$ g/2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Os animais do grupo controle, ptx100 e tali10 foram injetados com salina (2,4  $\mu$ L) na região hipocampal. Dez dias após o tratamento com ptx foi realizado o teste. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM do tempo gasto pelo animal para encontrar o local onde estava a plataforma submersa. O número de animais por grupo variou de 9 a 21. \* vs Glu,  $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney.



**Figura 41. Inibição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) pela pentoxifilina.** A pentoxifilina (ptx) na concentração de 50 e 100  $\mu\text{M}$  foi incubada durante 30 min. na presença de homogenato a 10% de hipocampo de rato. Os números representam média  $\pm$  EPM da atividade da acetilcolinesterase por minuto, o número de determinações variou de 5 a 10. \* vs controle,  $p < 0,05$ , teste de Tukey-Kramer.

## *V- DISCUSSÃO*

---

## IV- DISCUSSÃO

---

A exposição de células nervosas a altas concentrações de aminoácidos excitatórios (AAE) tais como, glutamato e aspartato, leva à degeneração neuronal e à morte (Choi *et al.*, 1987; Manev *et al.*, 1989). Estudos pioneiros de Olney e cols (1971) mostraram que as propriedades neurotóxicas destes AAE estão relacionados as habilidades destes compostos em causar despolarização de neurônios e sugerem que a morte neuronal ocorre como consequência da superexcitação (Olney, 1971; Rothman & Olney, 1987). É sabido que os AAE interagem com no mínimo dois tipos de receptores. No primeiro grupo, os receptores estão acoplados a canais iônicos (ionotrópicos), sendo representados pelo NMDA e AMPA/cainato, enquanto o segundo grupo é constituído pelos chamados receptores metabotrópicos, acoplados à produção dos segundos mensageiros DAG e IP3. Os agonistas dos receptores ionotrópicos podem ocasionar degeneração neuronal *in vivo* e *in vitro* (Coyle & Schwarcz, 1976; Choi *et al.*, 1987; Koh *et al.*, 1990).

As características citopatológicas do dano observado após a exposição aos AAE se assemelha às mudanças neuropatológicas que se seguem após a isquemia cerebral (Brown & Brierly, 1972; Simon *et al.*, 1984; Van Reemps, 1984) ou atividade convulsiva prolongada (Evans *et al.*, 1984). Além disso, estudos de microdiálise demonstraram que durante a isquemia cerebral (Benveniste *et al.*, 1984; Butcher *et al.*, 1990; Baker *et al.*, 1991), hipoglicemia (Sandberg *et al.*, 1986) e trauma cerebral (Faden *et al.*, 1989), as concentrações extracelulares de glutamato estão muito aumentadas, alcançando níveis comparáveis àqueles observados após a adição de glutamato em concentração neurotóxica para culturas de células (Choi *et al.*, 1987). Como vários estudos mostram que antagonistas dos receptores NMDA e não NMDA protegem contra o dano neuronal associado com estas condições neuropatológicas (Bullock *et al.*, 1990; Swan & Meldrum, 1990; Gill *et al.*, 1992),

foi sugerido que este tipo de dano ocorre através da superestimulação destes receptores.

Vários mecanismos podem ser responsáveis pelo aumento nas concentrações extracelulares de glutamato e aspartato durante a isquemia. Um fator pode ser a despolarização exagerada induzida pela liberação destes aminoácidos do terminal sináptico, conseqüente ao aumento do potássio externo observado durante a isquemia (Astrup *et al.*, 1977; Attwell *et al.*, 1993). Outra possibilidade é o acúmulo no espaço extracelular dos AAE, devido a danos no sistema de recaptação dos mesmos (Fonnum, 1984; Nicholls & Attwell, 1990), como conseqüência da falência energética que acompanha a isquemia (Puksinelli & Duffy, 1983). Contudo alguns autores mostraram que a inibição do sistema de transporte não é suficiente para causar dano neuronal (Massieu *et al.*, 1995), o que contradiz este último mecanismo.

Evidências demonstram que o dano cerebral associado com a anóxia, trauma, derrame e talvez algumas doenças neurodegenerativas como a Coreia de Huntigton, podem ser parcialmente mediados por um aumento sustentado no nível de cálcio citosólico causado por uma ativação excessiva dos receptores do glutamato (Rothman & Olney, 1987; Choi, 1988; Sweeney *et al.*, 1995; Kristian & Siesjo, 1996; Velazquez *et al.*, 1997). No mínimo dois eventos têm papel nesta neurotoxicidade, o primeiro é um edema agudo das células causada pela despolarização com entrada de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e água, que é reversível se o glutamato for removido (Choi, 1987).

O segundo evento (talvez o mais significativo para a extensão da neurotoxicidade à tecidos perifocais a área da anóxia) é caracterizado pela ocorrência de uma lenta degeneração neuronal, que dependendo da concentração e do tempo de exposição pode ser resistente aos antagonistas não competitivos dos receptores dos AAE (Kemp *et al.*, 1987) ou à retirada do glutamato (Choi, 1987). Este segundo evento é absolutamente dependente dos níveis da cálcio citosólico

livre e não necessita ser precedido por edema (Benveniste *et al.*, 1988). Além disso, durante a isquemia, a entrada de cálcio via receptor NMDA contribue para o aumento imediato na cálcio citosólico e aproximadamente 50% do aumento sustentado na concentração de cálcio intracelular é atribuído à entrada de  $\text{Na}^+$  e subsequente liberação da mitocôndria, via sistema de troca  $2\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  (Zhang & Lipton, 1999).

Alguns autores demonstraram que a exposição de neurônios em cultura ao glutamato, aumenta o influxo de cálcio e aciona a ativação da proteína quinase C (PKC) e a translocação desta do citosol para a membrana neuronal (Wroblewski *et al.*, 1987; Vaccarino *et al.*, 1987). Inibidores da PKC, tais como os gangliosídios, inibem a ativação do receptor do glutamato e a translocação da PKC (por um mecanismo que não envolve o bloqueio direto da abertura dos canais de cálcio regulado pelo glutamato), protegendo os neurônios da morte neuronal induzida pelo glutamato e cainato (Favaron *et al.*, 1988). Alguns autores sugerem que a manutenção do cálcio citosólico livre que persiste após a remoção do glutamato, é devido a abertura de canais de cálcio preexistentes ou à fosforilação de calciosomas levando ao decréscimo na eficiência da capacidade de tamponar o cálcio (Volpe *et al.*, 1988).

Nosso trabalho objetivou induzir uma lesão hipocampal excitotóxica com glutamato, através da injeção estereotáxica direta na área, simulando uma grande liberação de glutamato e os eventos consequentes, como ocorreria durante uma hipóxia ou isquemia, só que mais localizada. Este modelo foi baseado em trabalhos que demonstram uma elevação das concentrações extracelulares de glutamato no hipocampo de ratos durante isquemia transitória (Benveniste *et al.*, 1984) e também na gravidade do dano da injeção intraestriatal e intrahipocampal de glutamato, NMDA e cainato (Choi, 1988; McDonald *et al.*, 1988). Na maioria destes trabalhos a injeção era única e unilateral, enquanto que no nosso trabalho testamos várias

concentrações e tipo de aplicações (única e unilateral ou múltipla e bilateral) e concluímos que a injeção de 96 µg divididas em 6 injeções de cada lado do hipocampo, mais se adequou ao nosso objetivo de lesar o hipocampo. Com esta lesão queríamos promover um dano no processo de aprendizagem e memória e tentar reverter ou bloquear este dano com a pentoxifilina (ptx), uma droga do grupo das metilxantinas, usada na claudicação intermitente e nos distúrbios isquêmicos vasculares periféricos.

A análise histológica mostrou dano celular a nível hipocampal nos animais que receberam a injeção de 96 e 192 µg (ou 200 e 400 mM) de glutamato, concentração esta correspondente a mais de 1000 vezes a concentração extracelular fisiológica, que é de aproximadamente 0,6 µM (Choi, 1988). Este autor demonstrou que só concentrações muito elevadas de glutamato conseguem produzir dano celular. No presente trabalho foram observados gliose, vacuolização citoplasmática, desarranjo da paliçada e picnose. Estes resultados possivelmente são devidos à superexcitação dos receptores dos AAE, com aumento nos níveis de cálcio intracelular e ativação de enzimas tais como endonucleases, proteases e óxido nítrico sintase, além de aumentos nas espécies reativas de nitrogênio. Cheung e cols. (1998) demonstraram que a exposição de cultura de neurônios à concentrações de glutamato em torno de 100 a 500 µM, induziu necrose caracterizada por um rápido edema (<2h) e perda da condensação da cromatina e insultos moderados (<20µM), não produziram edema agudo em 2h. Contudo, 24 h após a injúria, foram detectados núcleos apoptóticos em grande número, que foram atenuados pela adição de cicloheximida.

Os radicais livres podem ocasionar a morte celular, danificando proteínas, lipídios de membrana e DNA (Halliwell & Gutteridge, 1985). As espécies reativas de oxigênio (ROS) formadas durante a redução de oxigênio e sua conversão a água



incluem, radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ). Várias outras ROS são induzidas pela elevação da concentração intracelular de cálcio livre, que resulta em: ativação de fosfolipases, resultando na liberação de ácido araquidônico, que é então metabolizado pelas oxigenases (Verity, 1993); estimulação da conversão de xantina desidrogenase para xantina oxidase, que gera  $O_2^{\bullet-}$  (McCord, 1985) e estimulação da produção de óxido nítrico (NO), que leva à formação de peroxinitrito, um radical altamente destrutivo (Lipton *et al.*, 1993). As ROS podem também desestabilizar a homeostase do cálcio por danificar o transporte mitocondrial de elétrons, resultando na depleção de ATP, comprometendo as atividades das ATPases (Nicotera *et al.*, 1992).

As ROS aparentemente têm um papel central na injúria excitotóxica/isquêmica induzida pelos AAE em cultura de células (Dykens *et al.*, 1987; Yamauchi *et al.*, 1998) e isquemia *in vivo* (Hall *et al.*, 1991; Lancelot *et al.*, 1998). Mattson e cols. (1995) demonstraram que a exposição de neurônios hipocâmpais ao glutamato resulta na acumulação de peróxidos e que antioxidantes suprimem a elevação de cálcio pelo glutamato. Estudos *in vivo* também demonstraram uma neuroproteção dos antioxidantes (Clifton *et al.*, 1989). A origem das ROS induzidas pelo glutamato ainda é controversa. Foi sugerido que o influxo inicial de cálcio induz as ROS que em turno promove a elevação de  $[Ca^{2+}]_i$ . O cálcio pode induzir a acumulação de ROS por vários mecanismos, incluindo a estimulação da hidrólise de fosfoinositídeos, com acumulação de ácido araquidônico, que é oxidado pelas oxigenases (Sanfeliu *et al.*, 1990; Verity, 1993; Ciani *et al.*, 1996; Lancelot *et al.*, 1998); recaptção de cálcio pelas mitocôndrias, que prejudica o potencial de membrana (Mattson *et al.*, 1993) e ativação da óxido nítrico sintase, resultando na produção de NO, que reage com  $O_2^{\bullet-}$  para produzir peroxinitrito (Lipton *et al.*, 1993; Lancelot *et al.*, 1998) e a proteólise da xantina desidrogenase para produzir xantina oxidase, que cataliza a oxidação da hipoxantina ou xantina para ácido úrico com coincidente formação de  $O_2^{\bullet-}$  (McCord, 1985).

O NO é uma importante molécula mensageira envolvida no controle vasomotor e na homeostase vascular, com funções neuronais e imunológicas (Moncada & Higgs, 1993). É formado pela ativação da óxido nítrico sintase (NOS) que cataliza a conversão da L-arginina (utilizada como substrato) para citrulina. Várias isoformas de NOS já foram purificadas e clonadas (Marletta, 1993; Bredt & Snyder, 1994). A isoforma neuronal, nNOS e a endotelial, eNOS, são constitutivas, cálcio/calmodulina dependentes e produzem NO por curtos períodos em resposta a ativação de receptores. A isoforma presente nos macrófagos, mNOS é induzida por uma variedade de citocinas e uma vez expressa, sintetiza NO por longos períodos. A mNOS difere da neuronal e endotelial por ser cálcio independente (Nathan, 1992). A indução da mNOS é inibida por glicocorticóides e o NO produzido pelos macrófagos é uma molécula citotóxica para microrganismos e células tumorais, com outras consequências biológicas, tais como, vasodilatação, danos aos tecidos e choque séptico (Moncada & Higgs, 1993).

No SNC, o NO produzido pela isoforma neuronal em resposta a estimulação do receptor desenvolve várias funções como molécula mensageira (Dawson *et al.*, 1994), incluindo um papel importante nos processos de aprendizagem e memória (Böhme *et al.*, 1993). Entretanto, quando o NO é produzido em excesso, pode ocasionar a morte neuronal (Dawson & Snyder, 1994). Culturas de neurônios de córtex, hipocampo e caudato-putamen podem ser protegidas da neurotoxicidade pelo glutamato por aplicação de inibidores de NOS (Dawson *et al.*, 1991, 1993). Contudo, outros trabalhos demonstram que o NO pode ser neuroprotetor, por *downregulation* da atividade do receptor do glutamato, através da reação com grupos tiol no sítio redox modulatório do receptor NMDA (S-nitrosilação) (Lipton *et al.*, 1993). É sabido que, enquanto baixas doses de inibidores da NOS reduz o volume do infarto em modelos animais de isquemia focal (Dawson & Snyder, 1994; Carreau *et al.*, 1994), altas doses de inibidores da NOS exacerbam o volume do

infarto, provavelmente através de efeitos deletéricos sobre o fluxo sanguíneo cerebral (Carreau *et al.*, 1994).

O dano ao SNC frequentemente leva à perda permanente das funções neurológicas. Por suportar o crescimento neuronal e o metabolismo, as células gliais podem ser responsáveis, em parte, pela recuperação observada após injúria do SNC (Silver & Sidman, 1980; Giulian, 1987). Embora astrócitos e micróglia reativas, além dos macrófagos residentes ou sanguíneos apareçam após um insulto ao SNC (Rio-Hortega, 1932; Bignami & Dahl, 1976; Giulian & Robertson, 1990; Landis, 1994), ainda não se esclareceu como estas células influenciam a sobrevivência neuronal, regeneração axonal ou recuperação das funções neurológicas. Os astrócitos foram considerados por muito tempo como um tipo de célula que impedia a regeneração neuronal (Berry *et al.*, 1983). Entretanto a maioria dos estudos *in vitro* mostram que estas células suportam o crescimento neuronal e a sobrevivência (Ferrara *et al.*, 1988).

Microglia e astroglia desempenham um papel fundamental na sobrevivência de neurônios após o dano do SNC. Giulian e cols. (1993) mostraram que a microglia ativada secreta pequenas moléculas de fatores neurotóxicos (<500Da), estáveis ao calor e com atividade bloqueada pelos antagonistas do receptor NMDA, enquanto a astroglia libera proteínas (>10kDa) que promovem o crescimento neuronal. As proteínas liberadas das astroglias atenuam a toxicidade da microglia, sugerindo que diferentes populações gliais têm ações opostas sobre a sobrevivência neuronal. Os macrófagos secretam um número de agentes que sobre certas condições servem como citotoxinas (Nathan *et al.*, 1980) e alguns destes fatores podem ser liberados pela microglia e agem como neurotoxinas durante o curso do trauma do SNC. Uma das primeiras a ser identificadas foram os ânions superóxidos (Giulian & Baker, 1986; Colton & Gilbert, 1987). Outras moléculas liberadas pelos macrófagos agem como citotoxinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) (Montgomery &

Cohn, 1989), proteínas do sistema complemento (Stecher & Thorbecke, 1967), interferons (Dinarelo & Wolff, 1978), proteases (Adams, 1980) e lipases (Khoo *et al.*, 1981), peróxido de hidrogênio (Nathan & Root, 1977), NO (Liew & Cox, 1991) além de ânions superóxidos (Johnston *et al.*, 1978)

A pentoxifilina (ptx), usada neste trabalho, na dose de 100mg/kg, apresentou efeito protetor no dano neuronal induzido pelo glutamato. Foi observado uma diminuição da lesão, com menor quantidade de células gliais, vacuolização e picnose. O mecanismo desta proteção local não está claro, por ser esta, uma droga com muitas propriedades, hemorreológicas (Accetto, 1982), vasodilatadoras (Baumann, 1976), inibidora da fosfodiesterase tipo IV (Stefanovich, 1978) e antagonista do receptor da adenosina do tipo A1. Além destas, a ptx possui também propriedades antiinflamatórias (Zabel, *et al.*, 1993) e deste modo, o seu efeito pode ter sido multimediado. Já está demonstrado que a ptx diminui a formação e síntese de citocinas, tais como TNF- $\alpha$  e interleucinas, como a IL-1 e IL-6 e inibe a ativação da microglia por estes compostos, além de aumentar a produção de IL-10, uma citocina protetora (Liang *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 1999). É portanto provável que estes efeitos tenham contribuído para a ação citoprotetora da ptx. Além disso Sinha e cols. (1995) mostraram que a supressão da produção de TNF- $\alpha$  induzida por inibidores da fosfodiesterase, como a pentoxifilina, está positivamente correlacionada com o aumento nos níveis de AMPc induzidos por estas drogas.

O papel do TNF- $\alpha$  na isquemia cerebral ainda é controverso, assim alguns autores demonstraram efeitos benéficos, enquanto outros detectaram efeitos danosos. Meistrell e cols. (1997) usando um modelo de isquemia focal permanente em ratos, em que o volume do infarto cerebral é medido após a oclusão permanente da carótida arterial média, observaram que a administração cortical de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  (P114) e sistêmica de um inibidor da síntese de TNF- $\alpha$  cerebral (CNI-1493) reduziram significativamente o infarto e conseqüentemente o dano isquêmico

até 2h após o início da isquemia. Outros trabalhos confirmaram estes achados (Nawashiro *et al.*, 1997). Feurstein e cols. (1998) demonstraram que a administração de TNF- $\alpha$  diretamente no parênquima cerebral produzia edema pericapilar e adesão leucocitária e quando injetado antes da isquemia, ocasionava um aumento na extensão do dano tecidual e déficits neurológicos. Foi demonstrado que os níveis de citocinas pro-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , estavam aumentados no corpo estriado e líquido cefalorraquidiano de pacientes com doença de Parkinson ( Mogi *et al.*, 1999). O mecanismo pelo qual o TNF- $\alpha$  induz a apoptose e células neuronais não está claro, estudos usando culturas de células PC12, demonstraram que o fator de crescimento do nervo (NGF), mas não a insulina, protege estas células da apoptose induzida pelo TNF- $\alpha$ , indicando que o mecanismo não envolve receptores ligados à tirosina quinase, além disso, foi demonstrado que células PC12 expressam em grande quantidade Bcl-2 (um fator anti-apoptótico), se tornavam resistentes à apoptose induzida pelo TNF- $\alpha$  e que os inibidores da protease caspase-3, inibiam a apoptose nestas células ( Havit & Stein, 1999).

Por outro lado, foi demonstrado também um papel benéfico para o TNF- $\alpha$ . Assim, Carlson e cols.(1998) demonstraram uma proteção pelo TNF- $\alpha$  contra a excitotoxicidade induzida pelo NMDA em cultura de células corticais. Além disso, foi demonstrado um aumento na produção intratecal de TNF- $\alpha$  em pacientes com demências, tipo doença de Alzheimer ou vascular e demonstraram uma correlação negativa entre esta citocina e os níveis de Fas/APO-1 (proteínas que expressam os níveis de apoptose celular) e da proteína tau, ambas considerados como parâmetros relacionados ao dano cerebral. Estes autores também demonstraram que os níveis de Bcl-2, foi aumentado 3 vezes em sobrenadante de cultura de células neuronais humanas expostos ao TNF- $\alpha$ , fato que os levou a sugerir que o TNF- $\alpha$  exerce seus efeitos neuroprotetores por estimular as células a expressar a molécula Bcl-2, que inibe a apoptose (Tarkowski *et al.*, 1999). Além disso, Tamatani e cols. (1999)

demonstraram que a neuroproteção induzida pelo TNF- $\alpha$  contra os danos induzidos por hipóxia ou óxido nítrico, eram devidos à expressão da Bcl-2 e da Bcl-X, feita através da ativação do fator nuclear de transcrição NF-kappaB. Mais estudos deverão ser feitos para comprovar o real papel desta citocina no dano isquêmico.

Bona e cols (1997) demonstraram que a teofilina, uma xantina, antagonista não seletivo do receptor da adenosina, reduziu a injúria cerebral, em um modelo de hipóxia/isquemia, nas doses de 20 a 60 mg/kg, sendo este efeito não dependente da temperatura, fluxo sanguíneo cerebral e glicose sanguínea. Um registro da amplitude dos potenciais evocados somatosensoriais em ratos anestesiados submetidos à isquemia, mostraram que a pentoxifilina e a cafeína recuperaram a amplitude que estava diminuída pela isquemia (Evans *et al.*, 1999). Foi demonstrado também, que os antagonistas do receptor da adenosina A2A protegem os neurônios dos efeitos dos aminoácidos excitatórios liberados durante a isquemia cerebral (Ongini *et al.*, 1997). Além dos efeitos já descritos para a pentoxifilina, já está demonstrado que esta droga causa um aumento do fluxo sanguíneo cerebral em áreas como o córtex frontal, hipocampo e núcleo caudato pela ptx, o que contribui para a eliminação mais rápida do glutamato e diminuição dos efeitos danosos na área lesada (Izumo *et al.*, 1999).

Uma elevação nas concentrações cerebrais de adenosina são observadas durante a hipóxia, que promove neuroproteção através da ativação dos receptores do tipo A1 (Halle *et al.*, 1997). A adenosina age nos neurônios e células da glia, nos primeiros ela ativa a condutância ao K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>, o que limita a despolarização, diminuindo o influxo da Ca<sup>2+</sup> através do canal dependente de voltagem e do canal acoplado ao receptor NMDA. Esta resposta é mediada pelo receptor A1 e é responsável pela proteção contra o dano neuronal. Nas células da glia, o efeito prevalente da adenosina, é regular a influência nos sinais dependentes de cálcio e AMPc, que determinam a taxa de proliferação e o estado de diferenciação celular.

Quando os receptores metabotrópicos são ativados em astrócitos, uma mobilização do cálcio é iniciada pela adenosina. Este sinal mediado pelo receptor A1 causa uma potencialização prolongada no aumento de AMPc mediado pelo receptor A2. Este aumento leva à diferenciação dos astrócitos e à expressão de canais de  $K^+$  e  $Cl^-$  que são requeridos para os astrócitos manterem a homeostase iônica. Efeito semelhante também pode ser obtido pela propentoxifilina (um bloqueador da adenosina e inibidor da fosfodiesterase), que além disto, estimula a produção de fatores neurotróficos (Schubert *et al.*, 1997).

No nosso trabalho não conseguimos mostrar uma elevação nos níveis de peróxidos lipídicos pela exposição ao glutamato, usando o método da dosagem de malonildialdeído (MDA). O fato da análise ter sido realizada 15 dias após a lesão pode ter interferido na dosagem destas espécies reativas instáveis. Alternativamente a pouca sensibilidade e principalmente in especificidade do método, pode ter sido responsável pela não detecção de alterações destas substâncias. Outros trabalhos demonstraram que a pentoxifilina reduz a peroxidação lipídica induzida pela indometacina na mucosa gástrica de ratos, protegendo contra o dano na mucosa gástrica (Sallingova & Kohut, 1994).

Por outro lado, demonstramos um aumento nos níveis de nitrato/nitrito que foram revertidos aos níveis normais pelo tratamento com ptx. Lauterbach e cols. (1995) demonstraram que a pentoxifilina suprime a produção de NO liberada pelos macrófagos, enquanto outros observaram uma diminuição da síntese de nitrito pela pentoxifilina em cultura de macrófagos (Vadiei *et al.*, 1996) e estes resultados fortalecem os achados do nosso trabalho. O mecanismo de ação pelo qual a pentoxifilina diminui a síntese de NO é incerto. Não está claro se a pentoxifilina age diretamente inibindo o caminho L-arginina-NO ou se a inibição do NO seja causada indiretamente, como consequência da redução da produção de  $TNF-\alpha$  e consequentemente da indução da NO sintase.

Estudos recentes mostram que o estresse oxidativo está intimamente envolvido nos mecanismos de excitotoxicidade, assim, foi demonstrado que em microdialisados obtidos após perfusão com o glutamato (1,5 a 15  $\mu$ M) e analisados em cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), a produção nos níveis de MDA, estava aumentada em torno de 6 vezes (Yang *et al.*, 1998). Outros estudos (Keller *et al.* 1998), demonstram que derivados análogos do AMPc ou GMPc atenuam a produção de produtos da peroxidação lipídica associados com o estresse oxidativo. Resultados similares foram obtidos por outros autores, quando as células neurais foram pre-tratadas com o inibidor de fosfodiesterase, zaprinast ou isobutilmetilxantina (IBMX). Estes resultados são consistentes com um possível papel neuroprotetor para os nucleotídeos cíclicos em desordens associadas com o aumento na peroxidação lipídica

Nosso trabalho mostrou que a lesão induzida pelo glutamato leva à diminuição nos níveis de AMPc e o tratamento com ptx conseguiu reverter estes efeitos e trazer os níveis a valores normais. É possível que o AMPc por diminuir o influxo de cálcio pelos receptores do glutamato tenha contribuído para a melhora da lesão observada no nosso trabalho. Estudos em cultura de células de oligodendrócitos demonstram que um aumento do influxo de cálcio induzido por agonistas de receptor do glutamato é atribuído principalmente ao fluxo de cálcio através dos canais do receptor do tipo AMPA (Fulton *et al.*, 1992; Yoshioka *et al.*, 1995; Meucci *et al.*, 1996). E, drogas que aumentam os níveis de AMPc, tais como foscolina, dibutiril-AMPc e propentoxifilina, inibem este influxo de cálcio induzido pelo cainato, por um mecanismo que não envolve síntese proteica, mas pode ser mediado por modulação da dessensibilização do receptor AMPA (Yoshioka *et al.*, 1998). Além disso, este estudo revelou que na presença do ácido okadaico, um inibidor de fosfatase, a foscolina suprimiu o influxo de cálcio e a liberação de desidrogenase láctica, e que os efeitos supressores foram parcialmente revertidos por H-89, um inibidor de proteína quinase A (PKA), levando a hipótese, de que estes



agentes exercem seus efeitos por ativação da fosforilação de proteínas de membrana associadas com canal de cálcio mediado pela PKA. Outros trabalhos demonstram que em neurônios hipocampais, a foscolina inibiu a elevação do cálcio intracelular e a morte celular induzida pelo glutamato (Mattson *et al.*, 1988; Tominaga *et al.* 1996). O mesmo foi observado com o rolipram, um inibidor da fosfodiesterase tipo IV que reduziu o dano neuronal na região hipocampal CA1, induzido por isquemia cerebral (Kato *et al.*, 1995).

Vários estudos indicam que os nucleotídeos cíclicos gerados como segundo mensageiros desempenham papel importante na excitoproteção. Em cultura de células hipocampais, agentes que elevam os níveis de AMPc, como dibutilil-AMPc e foscolina protegem neurônios da citotoxicidade por glutamato (Mattson & Kater, 1988). Estes compostos inibem a apoptose de neurônios cerebelares induzida por altas concentrações de potássio (D'Mello *et al.*, 1993). Em experimentos feitos com fatias de cerebelo, Garthwaite & Garthwaite (1988) evidenciaram que o GMPc também exerce um papel citoprotetor.

Barger e cols. (1995) demonstraram que análogos do GMPc atenuam e inibidores da proteína quinase dependente de GMPc potenciam a excitotoxicidade induzida por glutamato em cultura de células hipocampais. Também foi evidenciado que o glutamato estimula a produção de GMPc como resultado da ativação da NOS e esta estimula a guanilil ciclase solúvel. Talvez a ativação do sistema GMPc junto com o sistema de manutenção celular da homeostase do cálcio, sejam mecanismos para prevenir a elevação sustentada de  $[Ca^{2+}]_i$ . De fato, a exposição de neurônios hipocampais a análogos do GMPc resulta na redução do  $[Ca^{2+}]_i$  e uma resposta atenuada do cálcio ao glutamato (Barger *et al.*, 1995). É sabido que os fatores neuroprotetores endócrinos podem utilizar o sistema GMPc. Por exemplo, formas secretadas da proteína precursora  $\beta$ -amilóide protegem neurônios contra insultos

excitotóxicos (Mattson *et al.*, 1993) por um mecanismo que aparentemente envolve a supressão do influxo de cálcio mediada por GMPc.

A perda da memória recente é um dos eventos iniciais e piores sintomas da velhice no homem. Um dano similar na memória de curto prazo e na aquisição de nova informação é detectado como consequência de um dano bilateral no hipocampo (Milner, 1978; Woods *et al.*, 1982). Estudos anatômicos e bioquímicos têm demonstrado que o hipocampo é particularmente vulnerável à velhice em seres humanos e em animais (Geinisman & Bondareff, 1976; Landfield *et al.*, 1981), sendo os déficits de memória que acompanham o processo de envelhecimento, o resultado de uma falência gradual e progressiva na função hipocampal. Além disso, evidências da perda de fibras colinérgicas com o envelhecimento e em doenças neurodegenerativas como é o caso da doença de Alzheimer (Terry & Davies, 1980; Bartus *et al.*, 1982) podem comprometer a função hipocampal da qual a memória recente depende.

O modelo do labirinto aquático de Morris é bastante usado para avaliação da habilidade e aprendizado espacial em roedores (Morris, 1981). A tarefa requer que o animal encontre uma plataforma submersa em uma piscina circular contendo água opaca. Pistas colocadas à distância, tais como as características da sala, objetos, armários, são usados pelo animal para se localizar no ambiente, sem a presença de pistas olfatórias, auditivas ou visuais colocadas próximos para guiar o animal para a plataforma. Também não são definidos caminhos para a plataforma, embora um animal possa aprender a localizar a plataforma circulando a piscina a uma distância apropriada da parede. Vários pesquisadores têm identificado sítios de lesões e tratamentos farmacológicos que produzem déficits na aprendizagem da tarefa no labirinto, sem alterar a habilidade em nadar ou ver as pistas.

Em particular, as lesões na formação hipocampal e em algumas áreas neocorticais parecem prejudicar o aprendizado no que se refere à localização da plataforma, sem afetar a capacidade de natação (Kolb et al., 1982; Schenk & Morris, 1985, Sutherland *et al.*, 1983). Uma dissociação similar na habilidade de aprender é produzido pelo tratamento com drogas que bloqueiam os receptores muscarínicos colinérgicos ou glutamatérgicos do tipo NMDA (Sutherland *et al.*, 1982; Whishaw *et al.*, 1985; Morris *et al.*, 1986)

No modelo de lesão hipocampal com glutamato usado em nosso trabalho mostramos um dano na aquisição e retenção de memória, nos animais lesados com glutamato. No modelo do labirinto aquático de Morris, no qual o animal tem que lembrar o local onde se localiza uma plataforma submersa, se orientando pelos objetos existentes na sala (memória espacial), a região hipocampal tem grande participação como local de estocagem da memória. Observamos um dano na memória nos animais lesados com este modelo, sem alteração na capacidade de nadar. A pentoxifilina na dose de 200mg/kg administrada diariamente durante uma semana, após a lesão, demonstrou ser capaz de melhorar os déficits de memória induzido pelo glutamato neste modelo. Do mesmo modo, a pentoxifilina, em doses variando de 50 a 200mg/kg também demonstrou uma ação significativa melhorando os déficits de memória no modelo de memória emocional, no qual o animal aprende a evitar um estímulo aversivo, choque (esquiva passiva), que envolve o sistema límbico, do qual fazem parte o hipocampo, amígdala, septo medial, bulbo olfatório e áreas talâmicas anteriores, interconectadas, formando o circuito de Papez.

Os nossos resultados mostraram que a pentoxifilina atuou, tanto na memória recente (poucos minutos após o aprendizado), quanto na memória mais tardia (um dia após o aprendizado). Trabalhos indicam que os processos de memória de curta duração (MCD) são responsáveis pela cognição, enquanto a memória de longa duração (MLD) está sendo formada, este último processo, demorando muitas horas

para ocorrer. A maior questão é se a MCD é um caminho para a MLD ou uma entidade separada. Recentes experimentos (Izquierdo *et al.*, 1999), têm demonstrado que muitas drogas aplicadas no hipocampo, cortex entorrinal e parietal podem bloquear a formação da MCD sem afetar a MLD, mostrando que a MCD e MLD envolvem mecanismos separados, apesar de ter sido demonstrado que alguns tratamentos influenciam os dois tipos de memória, sugerindo uma ligação entre ambos. As regiões envolvidas na formação dos tipos de memória também são diferentes. O córtex pre-frontal anterolateral é crucial para a MLD e para a memória de trabalho (*working memory*), mas não está envolvido na MCD, o hipocampo, córtex entorrinal e parietal são cruciais para os três tipos de memória, em alguns casos, usando diferentes tipos de receptores. A amígdala não está envolvida na memória de trabalho ou na MCD, mas tem um importante papel na modulação da fase inicial da MLD .

Já no modelo do labirinto em T, não observamos um dano pronunciado na retenção do aprendizado, apesar de observamos uma dificuldade em aprender, nos animais lesados com glutamato. Possivelmente este modelo, que envolve mais a memória não declarativa ou implícita, relacionada aos hábitos e habilidades (codificados no corpo estriado e córtex motor), à identificação prévia (codificada no neocórtex) ou à aprendizagem não associativa (Squire & Knowlton, 1994), não seja adequado para o estudo da memória em animais com lesão hipocampal. No nosso trabalho a administração de CPA (agonista da adenosina A1) além de não reverter os efeitos benéficos da pentoxifilina nos danos de memória, mostrou um efeito por si só, melhorando os déficits de memória induzidos pelo glutamato. O fato de receptores da adenosina ativados pelo CPA protegerem as células do dano induzido pelo glutamato pode ter contribuído para este efeito, sem contudo interferirem diretamente nos processos cognitivos, já que os testes de memória foram realizados em torno de 15 dias após o tratamento com CPA. Neste caso, a droga não estaria

mais presente em concentrações circulantes eficazes, de modo a interferir negativamente nos testes.

Os efeitos dos agonistas e antagonistas da adenosina (subtipo A1) nos processos de cognição, quando administrados agudamente são inconsistentes. Assim, embora tenha sido demonstrado que os agonistas A1, tais como, CPA e N<sup>6</sup>-(1-metil-2-feniletiladenosina (R-PIA) causam dano na retenção da memória, no teste de esQUIVA passiva (Normile & Barraco, 1991), não foi demonstrado nenhum efeito na memória declarativa em ratos (Pontecorvo *et al.*, 1991). Similarmente, dados da literatura mostram que embora o antagonista A1, ciclopentil-1,3-dipropilxantina (CPX) não tenha demonstrado efeito de melhorar a memória no teste de esQUIVA passiva (Normile & Barraco, 1991), outro antagonista, KFM19, produz um aumento na aquisição da memória no labirinto em Y (Schingnitz *et al.*, 1991). Trabalhos em seres humanos demonstraram que a cafeína (um antagonista não seletivo do receptor da adenosina) melhora a função cognitiva (Riedel *et al.*, 1995), e esta ação foi atribuída ao antagonismo do receptor A2, que está envolvido na retenção e consolidação da memória (Kopf *et al.*, 1999). Já quando o uso dos agonistas e antagonistas A1 é crônico, se observam resultados inversos. O efeito prolongado da exposição aos agonistas A1 resulta em mudanças adaptativas, assim, a administração crônica de CPX foi ineficaz ou causou apenas um pequeno prejuízo na aquisição de memória no labirinto aquático (von Lubitz *et al.*, 1993). Por outro lado, o tratamento crônico com CPA, melhorou significativamente a aquisição e a retenção da memória, assim como o tratamento crônico com R-PIA, previniu a perda de memória em ratos treinados.

Como já demonstrado no nosso trabalho, os animais lesados no hipocampo com glutamato apresentavam uma diminuição nos níveis de AMPc e o tratamento com pentoxifilina, conseguia fazer com que os níveis deste nucleotídeo retornassem aos valores normais. O AMPc está envolvido nos processos de consolidação e

estocagem da memória, é possível que os efeitos benéficos da pentoxifilina nos déficits de memória induzido pela lesão com glutamato, ocorreram pelo menos em parte, através deste mecanismo, contudo considerando-se que a memória envolve muitos processos, a participação de outros mediadores não pode ser descartada.

Os sinais envolvendo AMPc/PKA/CREB-P (*cAMP response element binding phosphorylated protein*) têm um papel chave na ligação entre a fase inicial de formação da memória e plasticidade neuronal a longo prazo (Bevilaqua *et al.*, 1997; Cammarota *et al.*, 1999; Alberini, 1999). O fator CREB se torna ativo quando fosforilado e sua fosforilação é mediado pela proteína quinase A (PKA). Este caminho leva a ativação de genes cruciais para a persistência da memória na tarefa de esQUIVA inibitória em ratos após 3-6 h (Bernabeu *et al.*, 1997). O aprendizado na esQUIVA inibitória do tipo *one-trial step-down inhibitory* depende do hipocampo e da amígdala (Izquierdo & Medina, 1995) e após 3 a 6 h do teste é observado um aumento nos níveis de AMPc (Bernabeu *et al.*, 1996), CREB-P e da atividade da PKA (Bernabeu *et al.*, 1997) no hipocampo. Fibras serotoninérgicas, dopaminérgicas e noradrenérgicas inervam o hipocampo e a amígdala e receptores 5HT1A, D1 e  $\beta$ -adrenérgicas estão presentes nestas estruturas (Pohle *et al.*, 1979). É sabido que estas estruturas e estes receptores são responsáveis pela regulação do humor e das emoções (Izquierdo & Chaves, 1996).

Bevilaqua e cols. (1997) demonstraram que, a norepinefrina, aumenta a memória e o antagonista de PKA, KT5720 é amnésico, quando injetado no hipocampo, imediatamente após o treino, no modelo de esQUIVA passiva. Por outro lado, as drogas, 8-Br-AMPc, foscolina, SKF38393 (agonista D1), norepinefrina, e NAN-190 (antagonista 5HT1A) causaram facilitação da memória quando injetado 3h após o treino. Enquanto KT5720, SCH23390 (antagonista D1), timolol (antagonista  $\beta$ -adrenérgico) e OH-DPAT (agonista 5HT1A) causaram amnésia retrógrada. Além disso, com exceção da norepinefrina, todas as drogas mencionadas

anteriormente não causaram nenhum efeito significativo na memória, quando injetadas na amígdala, sugerindo que o hipocampo, mas não a amígdala esteja envolvido no processo de estocagem a longo prazo, da memória em ratos.

Já foi demonstrado um aumento na memória em roedores após a administração de catecolaminas (Roussinov & Yonkov, 1976) e neuropeptídios (de Weid & Versteig, 1979). Estes compostos utilizam AMPc como segundo mensageiro no cérebro, ativando proteínas quinases que irão causar fosforilação de proteínas que podem estar envolvidas nos processos de memória (Greengard, 1976). Compostos colinérgicos utilizam a via do GMPc como segundo mensageiro, mas podem agir também, através do sistema noradrenérgico elevando os níveis de AMPc (Mason, 1979). Foi hipotetizado que o AMPc cerebral pode agir como caminho final comum a várias classes de agentes farmacológicos que facilitam a memória em animais.

A administração parenteral de inibidores da fosfodiesterase como, papaverina, RO 20-1724 e isobutilmetilxantinas facilitam a retenção da memória em camundongos, em testes como: aprendizado no labirinto (*maze learning*) (Chute *et al.*, 1980; Routtenberg & Kim, 1978), esquiva passiva (*passive avoidance*) (Villiger & Chute, 1979; Villiger & Dunn, 1981), esquiva ativa (*suttle box active avoidance*) (Goto *et al.*, 1987) e aprendizado latente (*latent learning*) (Chute *et al.*, 1980). Foi demonstrado que, a injeção intracerebroventricular de dibutilil AMPc imediatamente após um treino no teste de esquiva passiva, aumenta a memória (Chute *et al.*, 1980). Estes resultados sugerem que a formação da memória pode ser mediado pela elevação do AMPc cerebral. Os experimentos de Randt e cols (1982) comprovam esta idéia, pois mostram um aumento da memória no teste de esquiva passiva com restrição da ingestão de água, em ratos tratados com rolipram, um inibidor de fosfodiesterase tipo 4 e relacionaram este efeito aos aumentos nos níveis de AMPc no córtex frontal.

Estudos com inibidores de fosfodiesterase sugerem que a facilitação da memória em animais com não é o resultado de um aumento na liberação de norepinefrina imediatamente após o treinamento e administração destes inibidores (Chute *et al.*, 1980; Villiger & Dunn, 1981), mas preferivelmente, é o resultado do aumento nos níveis de AMPc agindo como segundo mensageiro para uma variedade de neurotransmissores e peptídios (de Weid & Versteig, 1979; Weigant *et al.*, 1979). Testes clínicos usando a papaverina cronicamente, como um agente que melhora a memória, em pacientes com demência moderada, mas não grave, apresentaram resultados favoráveis no teste de escores (Yesavage *et al.*, 1979). Contudo, outros trabalhos não demonstrarem nenhum efeito benéfico nesta condição (Branconnier & Cole, 1977).

Em desacordo com o nosso trabalho, Izquierdo & Cardinalli (1981); Cardinalli, (1977) e Cardinalli, (1978) relataram que cafeína, pentoxifilina e aminofilina prejudicavam a retenção no teste de esQUIVA passiva em camudongos jovens, levantando a hipótese de que estas substâncias exerciam esta ação, agindo no metabolismo das monoaminas, aumentando o turnover da norepinefrina, os níveis de triptofano e ácido 5-hidroxiindolacético e inibindo a recaptação sinaptossomal de norepinefrina, dopamina, serotonina e do glutamato .

A formação hipocampal é um componente do substrato neural do aprendizado e da memória (Otton, 1983; Zola-Morgan *et al.*, 1986). A estimulação de alta frequência na formação hipocampal promove um aumento prolongado na transmissão sináptica. Este aumento dura mais de uma semana em animais intactos e várias horas em preparações de fatias de hipocampo e foi chamado de LTP ou potenciação de longa duração (*long term potentiation*- LTP) (Bliss & Lomo, 1973; Schwarzkroin & Wester, 1975; Malenka & Nicoll, 1999). Embora o mecanismo da LTP ainda não seja totalmente compreendido, o cálcio é necessário para acionar a LTP nas regiões hipocampais CA1 e CA3 e a injeção de queladores de cálcio



bloqueia a indução da LTP nestas regiões (Lynch *et al.*, 1983; Williams & Johnston, 1989). Alguns autores hipotetizam que o AMPc também está envolvido na produção da LTP na região CA3, através de trabalhos que demonstram que a norepinefrina aumenta a amplitude e a duração da LTP através de  $\beta$ -adrenoceptores (Hopkins & Johnston, 1988).

Os processos envolvidos na aprendizagem e memória dependem de alterações no número de sinapses entre neurônios pré e pós-sinápticos (Ma *et al.*, 1999). Estes autores investigaram os processos de plasticidade sináptica em culturas de neurônios hipocámpais das regiões CA1 e CA3 e verificaram que estes estão relacionados à fase tardia da LTP que depende de AMPc e de síntese proteica. Vários estudos têm demonstrado que várias quinases, tais como, proteínas quinases, dependente de AMPc (PKA), dependente de cálcio (PKC) e dependente de cálcio/calmodulina, além de fosfatases como por exemplo a calcineurina e as proteínas fosfatases 1 e 2A) regulam a plasticidade neuronal por fosforilação e desfosforilação de proteínas essenciais para os processos básicos de mudanças adaptativas no SNC. Estas proteínas incluem receptores, canais iônicos, vesículas sinápticas e proteínas nucleares. Em geral, as quinases estão envolvidas na *upregulation* da atividade de substratos alvos, enquanto o inverso (*downregulation*) ocorre com as fosfatases (Tokuda & Hatase, 1998).

No SNC a plasticidade neuronal pode ser alterada através da modulação de canais iônicos envolvidos na transmissão sináptica, entre eles o canal iônico acoplado ao receptor do glutamato. O receptor AMPA e cainato são modulados pela PKA acoplada à receptores dopaminérgicos do subtipo D1 (Hatt, 1999). Um aumento na concentração intracelular de AMPc e da atividade da PKA potencia as correntes ativadas pelo cainato em motoneurônios no cordão espinhal, pelo aumento da afinidade do ligante ao receptor fosforilado. A rápida dessensibilização das correntes evocadas pelo AMPA normalmente observadas em células de retina são

completamente bloqueadas pelo aumento das concentrações intracelulares de AMPc (Hatt, 1999).

As metilxantinas têm ações múltiplas tais como, inibição da atividade da fosfodiesterase, bloqueio do receptor da adenosina, translocação do cálcio intracelular e potenciação do efeito das catecolaminas (Rall, 1985). Estes efeitos levaram a possibilidade de que as metilxantinas podem afetar a LTP através do acúmulo de AMPc, aumento do cálcio intracelular livre ou elevação da excitabilidade neuronal. Os trabalhos de Yoshitaka e cols (1990) demonstram que derivados das xantinas aumentam a LTP na região CA3 sendo menos efetivo na região CA1. A propentoxifilina aumentou a LTP em concentrações aproximadas de 5  $\mu$ M, já a pentoxifilina e a teofilina em concentrações entre 100 e 1000  $\mu$ M. Provavelmente o modo de ação da propentoxifilina difere daquele da pentoxifilina e teofilina, pois a concentração efetiva destas é duas ordens de magnitude maior. Além disso, foi mostrado que ativadores da adenililciclase como foscolina e análogos do AMPc como 8-bromo-AMPc (Hopkins & Johnston, 1988) e rolipram, um inibidor específico da fosfodiesterase tipo 4, sem ações no receptor da adenosina (Barad *et al.*, 1998) aumentam significativamente a amplitude e duração da LTP no hipocampo, além de melhorar déficits de memória induzidos por escopolamina, cicloheximida e choque eletroconvulsivo (Imanishi *et al.*, 1997).

Várias diferenças existem entre a LTP na região CA1 e CA3: a. os receptores NMDA estão envolvidos na indução da LTP na área CA1 mas não nas sinapses das fibras musgosas na região CA3 (Collingridge *et al.*, 1983; Harris *et al.*, 1984; Harris & Cotman, 1986), b. os  $\beta$ -adrenoceptores são responsáveis pela modulação da LTP em CA3 mas não em CA1 (Satoh *et al.* 1986; Hopkins & Johnston, 1988), c. os antagonistas muscarínicos tipo escopolamina bloqueiam LTP em CA3 mas não em CA1 (Tanaka *et al.*, 1989). Deste modo, os resultados que mostram um aumento pela propentoxifilina da amplitude da LTP em CA3 mas não em CA1 sugerem que

esta droga modula as ações de neuropeptídeos ou de neurotransmissores que estão envolvidos na modulação da LTP somente nas fibras musgosas na região CA3.

Os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc participam nos estágios iniciais e tardios da LTP, respectivamente. Foi demonstrado que o análogo do GMPc, Br-cGMP aumenta a retenção quando injetados no hipocampo imediatamente após o treino e o análogo do AMPc, Br-cAMP tem ação quando injetados 30 a 180 minutos após, indicando que o GMPc regula os estágios iniciais da memória e o AMPc está envolvido em uma fase mais tardia dos processos de memória (Bernabeu *et al.*, 1996). Já está demonstrado também, que os nucleotídeos melhoram os processos de aprendizagem e memória em ratos normais, mas não em ratos lesados no prosencéfalo basal e sobre certas circunstâncias, podem também modular a atividade do sistema monoaminérgico central (Miyazaki *et al.*, 1999).

A ineficácia resultante da administração exógena de colina em reverter a perda de memória pode refletir uma inabilidade do cérebro com deficiência energética, em acetilar e assim utilizar o excesso de colina (Bartus & Dean, 1981). Já está demonstrado que a pentoxifilina, aumenta a produção de ATP (Stefanovich, 1978) e promove uma melhora nos processos de memória de curta duração em ratos velhos, mas não em jovens, sendo este efeito não dependente da administração concomitante de colina exógena (de Toledo-Morrel *et al.*, 1984). Estudos de eletronicromicroscopia em cérebro de roedores com isquemia, demonstraram um alargamento das mitocôndrias, particularmente no hipocampo e em menor extensão no neocórtex de animais tratados com pentoxifilina (Hartmann *et al.*, 1977) e este efeito não foi associado com nenhuma alteração na integridade da estrutura mitocondrial. Como estas organelas são sítios de produção de energia oxidativa, pode-se sugerir, que o agente afeta o metabolismo energético *in vivo*.

Observamos que o glutamato aumentou a atividade locomotora na dose de 192  $\mu\text{g}$ , mas não em doses menores, por isso escolhemos a dose de 96  $\mu\text{g}$  para lesar os animais e fazermos o tratamento com a ptx. Nesta dose, o glutamato não alterou a atividade locomotora. Por outro lado, não observamos aumento da atividade com a ptx, mas a lesão com glutamato e o tratamento com a ptx aumentou a atividade locomotora, sugerindo que o efeito antagonista do receptor A1 da ptx, possa ter sido o responsável por este efeito. Trabalhos demonstram que apesar da ciclopentilxantina (CPX), um antagonista seletivo do receptor A1 não apresentar este efeito quando administrado sozinho, quando co-administrado com a dizocilpina (um antagonista do canal do receptor NMDA), se observa um aumento da atividade locomotora (Fraser *et al.*, 1997). Observamos também, que o tratamento prévio dos animais com ciclopentiladenosina (CPA), um agonista da adenosina A1, reverteu os efeitos da ptx, demonstrando um possível efeito da ptx, a nível deste receptor.

Outros trabalhos têm demonstrado, que os receptores A1 e A2A da adenosina, desempenham papel importante no controle da atividade motora e que o bloqueio destes receptores estão envolvidos nas propriedades estimulantes das metilxantinas (Popoli *et al.*, 1998). Também foi demonstrado uma interação antagonista entre a adenosina (A1) e a dopamina (D1), a administração de ciclopentilxantina (CPX), um antagonista do receptor A1, potencia a atividade motora do agonista D1, SKF 38393 (Popoli *et al.*, 1996). Outros estudos reforçam estes achados, e mostram que a adenosina pode produzir seus efeitos comportamentais, através da inibição do efeito modulatório negativo da adenosina nos receptores dopaminérgicos, assim, estimulando a atividade dopaminérgica (Garrett & Griffiths, 1997).. Consistente com esta interpretação, estudos pré-clínicos comportamentais demonstram que a cafeína produz efeitos comportamentais similares aos estimulantes dopaminérgicos, tais como, cocaína e anfetamina, incluindo o aumento da atividade locomotora e do comportamento rotatório em animais lesados com 6-hidroxi-dopamina, e alguns destes efeitos induzidos pela

cafeína podem ser bloqueados por antagonistas dopaminérgicos (Garrett & Griffiths, 1997).

O efeito depressor da atividade locomotora observado com agonistas A1 são aumentados pela administração crônica de cafeína (Nikodijevic *et al.*, 1993), consoante com uma regulação para cima (*upregulation*) dos receptores A1, enquanto que as respostas aos agonistas A2A são aumentadas sem haver *upregulation*, indicando um sinergismo entre os receptores A1 e A2A (Nikodijevic *et al.*, 1991). Alterações nas respostas comportamentais aos agentes colinominéticos após a administração crônica de cafeína podem ser explicados em termos de dessensitização dos receptores nicotínicos e em termos de *upregulation* dos receptores muscarínicos (Nikodijevic *et al.*, 1993).

A doença de Alzheimer (AD) é uma patologia neurodegenerativa manifestada entre os idosos e caracterizada primariamente por deficiências cognitivas (Bondi *et al.*, 1994). Estudos *post mortem* revelam uma extensiva degeneração neuronal do sistema colinérgico prosencefálico, particularmente o núcleo basalis de Meynert com projeções colinérgicas para o neocórtex e amígdala, (Mesulam *et al.*, 1983) e o septo medial com projeções colinérgicas para o hipocampo (Coyle *et al.*, 1983; Terry *et al.*, 1994). Além disso, o grau de degeneração está correlacionado com o grau de demência (Bartus *et al.*, 1982).

Estudos em animais confirmam o papel da transmissão colinérgica no aprendizado e memória, uma vez que os agentes colinomiméticos podem reverter os déficits de memória associados com a senescência, lesões neurotóxicas ou antagonismo colinérgico (Dekker *et al.*, 1991; Fibiger, 1991). As projeções colinérgicas para a amígdala são importantes para o desempenho no teste de esquiva passiva (Riekkinen *et al.*, 1993). Apesar dos distúrbios cognitivos em pacientes com AD estarem correlacionados com a disfunção colinérgica (Whitehouse, 1993), nem

todos os pacientes respondem a uma terapia de reposição colinérgica e aqueles pacientes que respondem, mostram somente pequena melhora na função mnemônica (Fibiger, 1992; Davis & Haroutunian, 1993). A disparidade entre os resultados dos estudos em animais e em seres humanos, junto com evidências de profundas mudanças em outros sistemas de neurotransmissores, tais como, noradrenérgico (Gottfries *et al.*, 1983) em pacientes com AD, têm estimulados estudos de sistemas múltiplos de neurotransmissores na modulação da memória (Sara, 1989; Decker McGaugh, 1991; Decker, 1993). Além disso, trabalhos demonstram uma interação entre o sistema colinérgico muscarínicos e o glutamatergico (NMDA) na memória. Assim a estimulação dos receptores podem melhorar danos na memória induzidos por antagonistas do receptor NMDA ( Meyer *et al.*, 1998).

Embora as investigações do papel da neurotransmissão colinérgica no aprendizado e memória focalizem primariamente a neurotransmissão muscarínica, trabalhos relatam uma diminuição da ligação aos receptores nicotínicos no cérebro de pacientes com AD (Whitehouse *et al.*, 1986), sugerindo que a via colinérgica nicotínica pode desempenhar um papel importante nos déficits cognitivos associados com a doença ou com a idade (Levin, 1992). O envolvimento dos receptores nicotínicos no aprendizado e memória é também sugerido pelos efeitos da nicotina em melhorar a memória, observados em experimentos em animais e humanos (Warburton & Wesnes, 1984; Levin, 1992). Em roedores, por exemplo, a administração após o treino de nicotina, melhora a retenção na tarefa de esQUIVA passiva (Haroutunian *et al.*, 1985) e aumenta o desempenho do animal no modelo da labirinto radial (Levin *et al.*, 1990). Ao contrário, a administração sistêmica ou central de mecamilamina, um bloqueador nicotínico, prejudica a aquisição da informação espacial no labirinto aquático de Morris, mas não afeta a recuperação da informação previamente adquirida (Decker & Majchrzak, 1992).

O modelo experimental dos tremores induzidos pela oxotremorina em camundongos têm sido relatado como adequado para a identificação inicial de drogas com ação colinérgica central, porque estas drogas têm um efeito estimulante direto nos receptores muscarínicos centrais (Iwasaki, *et al.*, 1992). Nosso trabalho demonstra um efeito colinérgico central da pentoxifilina. Assim, observamos uma potencialização pela ptx, dos tremores induzidos pela oxotremorina, um agonista muscarínico, com ação central. Egawa e cols.(1997) usando o mesmo modelo, demonstraram que o rolipram, também potenciava os tremores induzidos pela oxotremorina. Ademais, análogos do AMPc também apresentam atividade colinérgica e potencilizam as respostas da acetilcolina (Fu, 1993; Nakamura *et al.*, 1994). Além disso, observamos através da análise da densidade dos receptores muscarínicos, através da técnica de *binding*, que a pentoxifilina promoveu uma regulação para baixo (*downregulation*) do número de receptores muscarínicos após tratamento de uma semana, indicando uma superestimulação destes receptores.

O consumo de cafeína pode ser benéfico para uma melhora das funções cognitivas. Embora a cafeína seja reconhecida como um estimulante do SNC, a consequência mais importante da ação antagonista do receptor da adenosina, ocasionado por esta droga, é a estimulação colinérgica, o que pode levar à melhora das funções cognitivas, particularmente, a memória. Riedel e cols. (1994) demonstraram que a cafeína atenua os danos na memória induzidos por escopolamina em humanos.

Trabalhos anteriores demonstram um efeito de derivados das metilxantinas, IBMX e S-9977-2, em potenciar a transmissão colinérgica por aumentar o tempo constante de decaimento da corrente pós-sináptica inibitória e atribuíram este efeito a uma inibição da atividade da colinesterase (Trudeau *et al.*, 1992). Em nosso trabalho observamos também uma inibição da atividade da acetilcolinesterase, o que explicaria a ação colinérgica e conseqüentemente uma melhora nos processos de

memória. Garrone e cols. (1998) demonstraram que um tratamento subcrônico com um inibidor da AChE, a heptastigmina, tinha um efeito facilitador na memória espacial em ratos velhos, além disso, outro inibidor, o exelon (ENA 713) demonstrou efeito benéfico contra os danos na memória de trabalho (*working memory*) induzidos pela escopolamina em ratos (Ballard & McAllister, 1999). Além disso, estudos clínicos confirmam o efeito benéfico do inibidor de acetilcolinesterase, donezapil, em inibir a progressão e deteriorização dos sintomas da AD (Sirvio, 1999).

Outros pesquisadores demonstraram uma inibição de atividade da acetilcolinesterase, pela cafeína, uma metilxantina e por outros compostos como, anabasine e metilpirrolidina e sugeriram que a característica comum destes compostos seja o radical N-metil que pode ser importante para a ligação à molécula da colinesterase (Karadsheh *et al.*, 1991). Nakamura e cols. (1994) demonstraram que análogos do AMPc induzem a um aumento na atividade da colina acetiltransferase, enzima responsável pela síntese de acetilcolina, e promovem a sobrevivência de neurônios colinérgicos em cultura, estas evidências corroboram nossos achados de um efeito colinérgico da pentoxifilina por mecanismos distintos, podendo ter contribuído para os efeitos citoprotetor e de melhorar os déficits de memória evidenciados pela pentoxifilina neste trabalho.

A pentoxifilina tem sido bastante usada na doença vascular periférica (Porter *et al.*, 1982; Reich & Gillings, 1987), uma condição prevalente na população idosa. A sua eficácia no tratamento das doenças cerebrovasculares tem sido avaliada em vários estudos. Já foi demonstrada uma lentificação na progressão da demência em pacientes diagnosticados no critério de “demência multi-infarto”. A droga é efetiva em diminuir o risco de ataques de isquemia transitória, mas os dados são insuficientes para se determinar seu valor na prevenção e tratamento do derrame (Frampton & Brogden, 1995). O nosso trabalho usando um modelo de



citotoxicidade com glutamato, simulando os eventos desencadeados durante uma isquemia, demonstrou uma proteção contra o dano hipocampal com a pentoxifilina, possivelmente por inibição da síntese e produção de citocinas pelas células da microglia. Também demonstramos uma diminuição nos níveis de AMPc nos animais lesados e uma volta aos níveis normais nos tratados com pentoxifilina, o que pode ter contribuído para a melhora da lesão. Demonstramos também um dano no aprendizado e memória nos animais lesados e uma melhora significativa com o tratamento com pentoxifilina, possivelmente pela melhora da lesão e por aumento nos níveis de AMPc, mediador com grande participação nos eventos de iniciais e finais da formação da memória. Com bases nestes resultados e baseados na segurança da droga, concluímos ser a droga bastante eficaz em reverter ou inibir os danos na memória, podendo ser usada nos problemas cognitivos que acompanham as doenças neurodegenerativas ou o processo senil.

## *VI - CONCLUSÕES*

---

## VI- CONCLUSÕES

---

Os resultados da presente investigação nos permite concluir que:

- ❖ O glutamato injetado nas doses de 48 a 192  $\mu\text{g}$  na região hipocampal (CA1), ocasiona dano neuronal de intensidade moderada a grave, de modo dose-dependente, com as células apresentando, morte celular, com picnose, vacuolização, desorganização da paliçada e intensa gliose.
- ❖ A pentoxifilina na dose de 100 mg/kg, i.p. previne o dano neuronal causado pelo glu, na dose utilizada (96  $\mu\text{g}$ ), com 75% dos animais apresentando lesões de intensidade leve.
- ❖ Os animais lesados com glutamato apresentaram déficits de memória quando analisados em modelos que avaliam a memória espacial (labirinto aquático), memória emocional ou aversiva (esquiva passiva) e memória de não declarativa (labirinto em T elevado).
- ❖ A pentoxifilina nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, i.p., reverteu de modo significativo, os déficits de memória causados pelo glutamato, nos modelos do labirinto aquático e esquiva passiva, e também no labirinto em T elevado, embora neste caso, com menor intensidade..
- ❖ O pré-tratamento com CPA, um agonista do receptor da adenosina, do subtipo A1), não reverteu os efeitos da pentoxifilina na memória. Possivelmente o efeito da pentoxifilina na memória independe da participação de receptores da adenosina.

- ❖ A talidomida (um inibidor de TNF- $\alpha$ ), não potencializou os efeitos da pentoxifilina na memória. É possível que as doses de pentoxifilina utilizadas já tenham sido suficientes para produzir efeito máximo.
- ❖ A lesão com glutamato ocasionou diminuição nos níveis de AMPc, que foi revertido aos níveis normais pelo tratamento com pentoxifilina na dose de 100 mg/kg. A elevação dos níveis centrais deste nucleotídeo é importante para explicar os efeitos citoprotetores e na memória observados com a pentoxifilina.
- ❖ Um aumento nos níveis de nitrito/nitrato foi observado nos animais lesados com glutamato e este aumento foi revertido pelo tratamento com pentoxifilina (100 mg/kg, i.p.). Por outro lado, nenhum aumento foi observado nos níveis de peróxidos lipídicos nos animais lesados com glutamato na dose de 96  $\mu$ g.
- ❖ A pentoxifilina potencializou os tremores induzidos pela oxotremorina, agonista muscarínico, de uma maneira dose-dependente. Do mesmo, o tratamento durante 6 dias, com pentoxifilina na dose de 100 mg/kg, ocasionou uma diminuição no número de receptores muscarínicos (M1+M2) e inibiu a atividade da acetilcolinesterase, indicando uma atividade colinérgica central da pentoxifilina.
- ❖ O efeito citoprotetor da pentoxifilina pode ter decorrido da sua ação antiinflamatória, inibindo a liberação de citocinas, tais como TNF- $\alpha$ , além de espécies reativas de oxigênio. O aumento nos níveis centrais de AMPc produzido pela pentoxifilina e a sua atividade colinérgica contribuíram para a melhora nos déficits de memória causados pela lesão excitotóxica.



## *VII- REFERENCE BIBLIOGRAPHY*

---

## V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ACCETTO, B. Beneficial hemorheologic therapy of chronic peripheral arterial disorders with pentoxifylline: results of double-blind study versus vasodilator nylidrin. **Am. Heart J.**, v. 103, p. 864-869, 1982.
- ADAMS, D. O. Effector mechanisms of cytolytically activated macrophages. I. Secretion of neutral proteases and effect of protease inhibitors. **J. Immunol.**, v. 124, p. 286-292, 1980.
- ALBERINI, C. M. Genes to remember. **J. Exp. Biol.**, v. 202, p. 2887-2891, 1999.
- ALBIN, R. L., YOUNG, A. B., PENNEY, J. B., HANDELIN, B., BALFOUR, R., ANDERSON, K. D., MARKEL, D. S., TOURTELLOTTE, W. W., REINER, A. TOURTELLOTTE, W. W., REINER, A. Abnormalities of striatal projection neurons and N-methyl-D-aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p.1293-1298, 1990.
- ALBERS, G. W., GOLDBERG, M. P., CHOI, D. W. N-methyl-D-aspartate antagonists: ready for clinical trial in brain ischemia? **Ann. Neurol.**, v. 25, p. 398-403, 1989.
- AMBRUS, J. L., ANAIN, J. M., ANAIN, S. M., *et al.* Dose-response effects of pentoxifylline on erythrocyte filterability: clinical and animal model studies. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 48, p. 50-56, 1990.
- ANDERS, J. J., BRIGHTMAN, M. W. Assemblies of particles in the cell membranes of developing, mature and reactive astrocytes. **J. Neurocytol.**, v. 8, p.777-795, 1979.
- ANGELKORT, B. & BAUERDICK, H. Zum verhalten des herzhrythmus bei digitalisierten patienten mit zusätzlicher Pentoxifyllin-medikation. **Therapiewoche**, v. 32, p. 5369-5371, 1982.

- ANIS, N.A., BERRY, S.C., BURTON, N.R., LODGE, D. The dissociative anaesthetics ketamine and phencyclidine, selectively reduce excitation of central mammalian neurons by N-methyl-aspartate. **Br. J. Pharmacol.**, v. 79, p. 565-575, 1983.
- ANSON, J. & COLLINS, G. C. Possible presynaptic actions of 2-amino-4-phosphonobutyrate in the rat olfactory cortex. **Br J Pharmacol.**, v. 91, p. 753-761, 1987.
- ANTIGNANI, P. L., TODINI, A. R., SALICETI, F., PACINO, G., BARTOLO, M. Results of clinical, laboratory and haemorheological investigations of the use of pentoxifylline in high doses. **Pharmatherapeutica**, v. 5, p. 50-56, 1987.
- APARICIO, N. J., SCHWARZSTEIN, L., DE TURNER, E. A. Pentoxifylline (BL191) by oral administration in the treatment of asthenozoospermia. **Andrologia**, v. 12, p. 228-231, 1980.
- ARNAUD, M. J. The pharmacology of caffeine. **Prog. Drug. Res.**, v. 31, p. 273-313, 1987.
- ARSLAN, M., POHL, C. R., PLANT, T. M. DL-2-amino-5-phosphonopentanoic acid, a specific N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist, suppresses pulsatile LH release in the rat. **Neuroendocrinology**, v. 47, p.465-468, 1988.
- ASTRUP, J., SYMON, L., BRANSTON, N. M., LASSEN, N. A. Cortical evoked potential and extracellular  $K^+$  and  $H^+$  at critical levels of brain ischemia. **Stroke**, v. 8, p. 51-57, 1977.
- ATTWELL, D., BARBOUR, B., SZATKOWSKI, M. Nonvesicular release of neurotransmitter. **Neuron**, v. 11, p. 401-407, 1993.
- BAKER, A. J., ZORNOW, M. H., SCHELLER, M. S., YAKSH, T. L., SKILLING, S. R., SMULLING, D. H., LARSON, A. A., KUCZENSKI, R. Changes in extracellular concentrations of glutamate, aspartate, glycine, dopamine, serotonin, and dopamine metabolites after transient global ischemia in the rabbit brain. **J. Neurochem.**, v. 57, p. 1370-1379, 1991.



- BALLARD, T. M. & McALLISTER, K. H. The acetylcholinesterase inhibitor, ENA 713 (Exelon), attenuates the working memory impairment induced by scopolamine in an operant DNMTTP task in rats. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 10-18, 1999.
- BALAZS R., HACK, N., JORGENSEN, O. S. Stimulation of the N-methyl-D-aspartate receptor has a trophic effect on differentiating cerebellar granule cells. **Neurosci. Lett.**, v. 87:80-86, 1988.
- BANNERMAN, D. M., GOOD, M. A., BUTCHER, S. P., RAMSAY, M., MORRIS, R. G. M. Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. **Nature**, v. 378, p. 182-186, 1995.
- BARAD, M., BOURTCHOULADZE, R., WINDER, D. G., GOLAN, H., KANDEL, E. Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long term potentiation and improves memory. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 15020-15025, 1998.
- BARBARINO, C. Pentoxifylline in the treatment of venous leg ulcers. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 12, p. 547-551, 1992.
- BARGER, S. W., FISCUS, R. R., RUTH, P., HOFMANN, F., MATTSON, M. P. Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of the  $\beta$  amyloid precursor. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2087-2096, 1995.
- BARTUS, R. T. & DEAN, R. L. Age-related memory loss and drug therapy: possible directions based on animal models. In S. J. Enna, T. Samarajski, & B. Beer (Eds.), **Aging**, v. 17. **Brain neurotransmitters and receptors in aging and age-related disorders**. New York: Raven Press, 1981.
- BARTUS, R. T., DEAN, R. L., BEER, B., LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science (Washington, D. C.)**, v. 217, p. 408-416, 1982.

- BAUDRY, M. & MASSICOTTE, G. Physiological and pharmacological relationships between long-term potentiation and memory. **Concepts in Neurosci**, v. 2, p.79-98, 1992.
- BAUMANN, J. C. Doppler ultrasonic blood pressure measurements in limbs with occlusive arterial disease and in normal lower extremities under treatment with pentoxifylline. **IRCS Medical Sci.**, v. 4, p. 93, 1976.
- BEAVO, J. A. & REIFSNYDER, D. H. Primary sequence of cyclic nucleotide isoenzymes and the design of selective inhibitors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 150-155, 1990.
- BEAVO, J. A., ROGERS, N. L., CROFFORD, O. B., HARDMAN, J. G., SUTHERLAND, E. W., NEWMAN, E. V. Effects of xanthines derivatives on lipolysis and on adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase activity. **Mol. Pharmacol.**, v. 6, p. 597-603, 1970.
- BECHARA, A., TRANEL, D., DAMASIO, H., ADOLPHIS, R., ROCKLAND, C., DAMASIO, A. Double dissociation of conditioning and declarative knowledge relative to the amygdala and hippocampus in humans. **Science**, v. 269, p. 1115-1118, 1995.
- BECKMAN, J. S., BECKMAN, T. W., CHEN, J., MARSHALL, P. A., FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 1620-1624, 1990.
- BEERMANN, B., INGS, R., MANSBY, J., CHAMBERLAIN, J., McDONALD, A. Kinetics of intravenous and oral pentoxifylline in healthy subjects. **Clinical Pharmacol. Therap.**, v. 37, p. 25-28, 1985.
- BEKKERS, J. & STEVENS, C. NMDA and non-NMDA receptors are co-localized at individual excitatory synapses in cultured rat hippocampus. **Nature** v. 341, p. 230-233, 1989.
- BENJAMIN, A. M. & QUASTEL, J. H., Location of amino acids in brain slices from the rat, **Biochem. J.** v.128, p. 631-646, 1972.

- BENVENISTE, H., DREJER, J. SCHOUSBOE, A., DIEMER, N. H. Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral monitored by intracerebral microdialysis. **J. Neurochem.**, v. 43, p. 1369-1374, 1984.
- BENVENISTE, H., JORGENSEN, M. B., DIEMER, N. H., HANSEN, A. J. Calcium accumulation by glutamate receptor activation is involved in hippocampal cell damage after ischemia. **Acta Neurol. Scand.**, v. 78, p. 529-536, 1988.
- BERL, S., Biochemical consequences of compartamentation of glutamate and associated metabolites. In R.Balazs and J.E.Cremer (Eds.), **Metabolic Compartmentation in the Brain**, John Wiley and Sons, New York, 1973, p.3-17.
- BERNABEU, R., BEVILAQUA, L., ARDENGHI, P., BROMBERG, E., SCHMITZ, P., BIANCHIN, M., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. Involvement of hippocampal cAMP/cAMP dependent protein kinase signaling pathway in a late memory consolidation phase of an aversively motivated learning in rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, 1997.
- BERNABEU, R., PRINC., F., LEVI DE STEIN, M., FIN, C. *et al.*. Evidence for the involvement of hippocampal coproduction in the acquisition and consolidation of inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**, v. 6, p. 516-518, 1996.
- BERNABEU, R., SCHMITZ, P., FAILLACE, M. P., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. M. Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of na inhibitory avoidance learning. **Neuroreport**, v. 7, p. 585-588, 1996.
- BERRY, M., MAXWELL, W. L., LOGAN, A., MATHEWSON, A., McCONNELL, P., ASHHURST, D. E., THOMAS, G. H. Deposition of scar tissue in the central nervous system. **Acta Neurochir [Suppl]**, v. 32, p. 31-53, 1976.

- BERTZ, A. L. & GOLDSTEIN, G. W. Specialized properties and solute transport in brain capillaries. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 241-250, 1986.
- BEVILAQUA, L., ARDENGHI, P., SCHRÖDER, N., BROMBERG, E., QUEVEDO, J., SCHMITZ, P. K., BIANCHIN, M., WALZ, R., SCHAEFFER, E., MEDINA, J. H., IZQUIERDO, I. Agents that affect cAMP levels or protein kinase A activity modulate memory consolidation when injected into rat hippocampus but not amygdala. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, p. 967-970, 1997.
- BIAGGIONI, I., PAUL, S., PUCKETT, A., ARZUBIAGA, C. Caffeine and theophylline as adenosine receptor antagonists in humans. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 258, p. 588-593, 1991.
- BIAMINO, G. Influence of a single IV dose of pentoxifylline on central haemodynamics in patients with ischemic heart disease. **IRCS Med. Sci.**, v. 14, p. 82-84, 1986.
- BIANCHI, C. P. Pharmacological actions on excitation-contraction coupling in striated muscle. **Fed. Proc.**, v. 27, p. 126-131, 1968.
- BIDIANI, A. K., CHURCHILL, P. C., PACKER, W. Theophylline-induced changes in myoglobinuric acute renal failure: further characterization. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 65, p. 42-49, 1987.
- BIEVENU, J., DOCHE, C., GUTOWSKI, M-C. *et al.* Production of pro-inflammatory cytokines and cytokines involved in the TH1/TH2 balance is modulated by pentoxifylline. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25, p. 80-84, 1995.
- BIGNAMI, A. & DAHL, D. The astroglial response to stabbing. Immunofluorescence studies with antibodies astrocyte-specific protein (GFA) in mammalian and submammalian vertebrates. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 2, p. 99-110, 1976.

- BLACK, R. S., BARCLAY, L. L., NOLAN, K. A., THALER, H. T., HARDIMAN, S. T., BLASS, J. P. Pentoxifylline in cerebrovascular dementia. **J. Am. Geriatr. Soc.**, v. 40, p. 237-244, 1992.
- BLAGOSKLONNAYA, Y. V., MARMEDOV, R., KOZLOV, V. V., EMANUEL, V. L., KUDRYASHOV, M. I. Effect of Trental on some renal function parameters in diabetes mellitus patients. **Problemy Endokrinologii (moskva)**, v. 28, p. 3-8, 1992.
- BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus., **Nature**, v. 361, p. 31-39, 1993.
- BLISS, T.V.P. & LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **J Physiol.**, v. 232, p. 331-356, 1973.
- BLUHM, R. E., MOLNAR, J., COHEN, M. M. Effect of pentoxifylline on the energy metabolism of ischemic gerbil brain. **Clin. Neuropharmacol.**, v. 8, p. 280-285, 1985.
- BOHME, G. A., BON, C., LEMAIRE, M., REIBAUD, M., PIOT, O., STUTZMANN, J. M., DOBLE, A., BLANCHARD, J. C. Altered synaptic plasticity and memory formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 9191-9194, 1993.
- BOHUS, B. Humoral modulation of learning and memory processes: Physiological significance of brain and peripheral mechanisms. In J. Delacour (Ed.), **The memory system of the brain**, Singapore: World Scientific, 1994, p. 337-364.
- BOKSAY, J. & BOLLMANN, V. The effect of 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthine on the  $\beta$ -adrenergic receptors and on the activity of isoprenaline. **Arch. Int. Pharmacod. Therap.**, v. 194, p. 174-180, 1971.
- BONA, E., ADEN, U., GILLAND, E., FREDHOLM, B. B., HAGBERG, H. Neonatal cerebral hypoxia-ischemia: the effect of adenosine receptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 36, p. 1327-1338, 1997.

- BONDI, M. W., SALMON, D. P., BUTTERS, N. M. Neuropsychological features of memory disorders in Alzheimer's disease. In Terry R. D., Katzman, R., Bick, K. L. (Eds.), **Alzheimer disease**, Raven Press, New York, 1994, p. 41-64.
- BOSSONG, W. Klinische erfahrungen mit dem vasotherapeutikum Trental in der dermatologic. **Zeitschrift für Hautkrankheiten**. V. 46, p. 711-724, 1972.
- BOSTOCK, E., GALLAGHER, M., KING, R. A. Effects of opioid microinjections into the medial septal area on spatial memory in the rat. **Behavioral Neurosci.**, v. 102, p. 604-652, 1988.
- BOULENGER, J. P., PATEL, J., MARANGOS, P. J. Effects of caffeine and theophylline on adenosine and benzodiazepine receptors in human brain. **Neurosci. Lett.**, v. 30, p. 161-166, 1982.
- BRADFORD, H. F. & THOMAS, A. J. Metabolism of glucose and glutamate by synaptosomes from mammalian cerebral cortex, **J. Neurochem.**, v.16, p.1495-1504, 1969.
- BRADFORD, H. F. & WARD, H. K. On glutaminase activity in mammalian synaptosomes. **Brain Res.**, v.110, p. 115-125, 1976.
- BRANCONNIER, R. J. & COLE, O. Effects of chronic papaverine administration on mild senile organic brain syndrome. **Am. J. Geriat. Soc.**, v. 25, p. 458-462, 1977.
- BREDT, D. S., GLATT, C. E., HWANG, P. M., FOTUHI, M., DAWSON, T. M., SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. **Neuron**, v. 7, p. 615-624, 1991.
- BREDT, D. S., HWANG, P. M., SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, p. 768-770, 1990.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. Nitric oxide: a novel neuronal messenger. **Neuron**, v. 8, p. 3-11, 1992.

- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 682-685, 1990.
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. **Neuron**, v. 13, p.301-313, 1994.
- BREWER, G. J., COTMAN, C. W. NMDA receptor regulation of neuronal morphology in cultured hippocampal neurons. **Neurosci. Lett.**, v. 99, p.268-273, 1989.
- BRIGHTMAN, M. W. & REESE, T. S. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. **J. Cell. Biol.**, v. 40, p. 648-677, 1969.
- BRIONI, J. D. Role of GABA during the multiple consolidation of memory. **Drug Dev. Res.**, v. 28, p. 3-27, 1993.
- BRIONI, J. D., DECKER, M. W., GAMBOA, L. P., IZQUIERDO, I., McGAUGH, J. L. Muscimol injections in the medial septum impair spatial learning. **Brain Res.**, v. 522, p. 227-234, 1990.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situational factors. **Brit. J. Psychol.**, v. 48, p. 1-12, 1957.
- BRORSON, J. R., MANZOLILLO, P. A., MILLER, R. J.  $Ca^{2+}$  entry via AMPA/KA receptors and excitotoxicity in cultured cerebellar Purkinje cells. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 187-197, 1994.
- BROWN, A. W. & BRIERLY, J. B. Anoxic ischemic cell change in rat brain: light microscopic and fine structural observations. **J. Neurol. Sci.**, v. 16, p. 59-84, 1972.
- BROWN, T. H., KAIRISS, E. W., KEENAN, C. L. Hebbian synapses: biophysical mechanisms and algorithms. **Annu Rev Neurosci.**, v. 13, p. 475-511, 1990.
- BRUNNER, L. J., VADIEL, K., LYER, L. V., LUKE, D. R. Prevention of cyclosporine-induced nephrotoxicity with pentoxifylline. **Renal Failure**, v. 11, p. 97-104, 1989.

- BRUNS, R. F., LU, G. H., PUGSLEY, T. A. Characterization of the A<sub>2</sub> adenosine receptor labelled by [<sup>3</sup>H]NECA in rat striatal membranes. **Mol. Pharmacol.**, v. 29, p. 331-346, 1986.
- BUCHAN, A. & PULSINELLI, W. Septo-hippocampal deafferentation protects CA1 neurons against ischemic injury. **Brain Res.**, v. 512, p. 7-14, 1990.
- BULLOCK, R., GRAHAM, D. I., CHEN, M. -h., LOWE, D., McCULLOCH, J. Focal cerebral ischemia in the cat: pretreatment with a competitive NMDA receptor antagonist, D-CPPene. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 10, p. 668-674, 1990.
- BULT, H., BOECKXSTAENS, G. E., PEICKMANS, P. A., JORDAENS, F. H., VAN MAERCKE, Y. M., HERMAN, A. G. Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. **Nature**, v. 345, p. 346-347, 1990.
- BUREAU, Y. R. J., PEREDERY, O., PERSINGER, M. A. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380 mg/Kg) or lithium (3mEq/Kg) pilocarpine (30mg/Kg) induced seizures. **Brain Res.**, v. 648, p.265-269, 1994.
- BURNSTOCK, G. A basis for distinguishing two types of purinergic receptors. In: **Cell membrane receptors for drugs and hormones: A multidisciplinary approach**, ed. L. Bolis and R. N. Straub, Raven Press, New York, 1978, p. 107-118.
- BUTCHER, R. W. & SUTHERLAND, E. W. Adenosine 3', 5'-phosphate in biological materials. I. Purification and properties of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase and use of this enzyme to characterize adenosine 3',5'-phosphate in human urine. **J. Biol. Chem.**, v. 237, p. 1244-1250, 1962.
- BUTCHER, S. P., BULLOCK, R., GRAHAM, D. I., McCULLOCH, J. Correlation between amino acid release and neuropathological outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. **Stroke**, v. 21, p. 1727-1733, 1990.



- CAHILL, L. & McGAUGH, J. L. Amygdaloid complex lesions differentially affect retention of tasks using appetitive and aversive reinforcement. **Behav. Neurosci.**, v. 104, p. 532-543, 1990.
- CAHILL, L. & McGAUGH, J. L. Modulation of memory storage. **Curr. Opinion in Neurobiology**, v. 6, p. 237-242, 1996.
- CAMMAROTA, M., IZQUIERDO, I., WOLFMAN, M., LEVI DE STEIN, M., BERNABEU, R., JERUSALINSKY, D., MEDINA, J. H. Inhibitory avoidance training induces rapid and selective changes in [<sup>3</sup>H]AMPA receptor binding in the rat hippocampal formation. **Neurobiol of Learn. Mem.**, v. 64, p. 257-264, 1995.
- CAMAROTA, M., PARATCHA, G., BEVILAQUA, L. R., LEVI DE STEIN, M., LOPEZ, M., PELLEGRINO DE IRALDI, A., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. M. Cyclic AMP-responsive element binding protein in brain mitochondria. **J. Neurochem.**, v. 72, p. 2272-2277, 1999.
- CARDINALLI, D. P. Effect of pentoxifylline and aminophylline on biogenicamine metabolism of the rat brain. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 47, p. 239-243, 1978.
- CARDINALLI, D. P. Effect of pentoxifylline and theophylline on neurotransmitter uptake and release by synaptosome-rich homogenates of the rat hypothalamus. **Neuropharmacol.**, v. 16, p. 785-790, 1977.
- CARLSON, N. G., BACCHI, A., ROGERS, S. W., GAHRING, L. C. Nicotine blocks TNF-alpha-mediated neuroprotection to NMDA by an alpha-bungarotoxin-sensitive pathway. **J. Neurobiol.**, v. 35, p. 29-36, 1998.
- CARREAU, A., DUVAL, D., POIGNET, H., SCATTON, B., VIGE, X., NOWICKI, J., -P. Neuroprotective efficacy of N<sup>w</sup>-nitro-L-arginine after focal cerebral ischemia in the mouse and inhibition of cortical nitric synthases. **Eur. J. Pharmac.**, v. 256, p. 241-249, 1994.
- CARTER, C., LLOYD, K., ZIVKOVIC, B., SCATTON, B. J. Ifenprodil and SL 82.0715 as cerebral antiischemic agents. III. Evidence for antagonistic effects at

- the polyamine modulatory site within the N-methyl-D-aspartate receptor complex. **Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 253, p. 475-482, 1990.
- CHA, J. H. J., MAKOWIEC, R. L., PENNEY, J. B., YOUNG, A. B. L-<sup>3</sup>H]glutamate labels the metabotropic excitatory amino acid receptor in rodent brain. **Neurosc. Lett.**, v.113, p. 78-83, 1990.
- CHAMBERLIN, A. R. & BRIDGES, R. J. Conformationally constrained acid amino acids as probe of glutamate receptors and transporters. In Kozikowski A.P., ed. **Drug design for neuroscience**. New York: Raven Press, 1993, p.231-259.
- CHANG, F. L., GREENOUGH, W. T. Transient and enduring morphological correlates of synaptic activity and efficacy change in the rat hippocampal slice. **Brain Res.**, v. 309, p.35-46, 1984.
- CHAPMAN, R. A. & TUNSTALL, J. Pharmacology of calcium uptake and release from the sarcoplasmic reticulum: sensitivity to methylxanthines and ryanodine. In: **Handbook of Experimental Pharmacology: Calcium in drug actions**. v. 83, ed. P. F. Baker, Springer-Verlag, 1988, p. 199-216.
- CHENG, B. & MATTSON, M. P. IGF-I and IGF-II protect cultured hippocampal and septal neurons against calcium-mediated hypoglycemic damage. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 1558-1566, 1992.
- CHEUNG, N. S., PASCOE, C. J., GIARDINA, S. F., JOHN, C. A., BEART, P. M. Micromolar L-glutamate induces extensive apoptosis in an apoptotic-necrotic continuum of insult-dependent, excitotoxic injury in cultured cortical neurones. **Neuropharmacology**, v. 37, 1419-1429, 1998.
- CHOI, D. W. Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 465-469, 1988.
- CHOI, D. W. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system, **Neuron**, v. 1, p. 623-634, 1988.
- CHOI, D. W. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. **J. Neurosci.**, v. 7, p. 369-379, 1987.

- CHOI, D. W. Methods for antagonizing glutamate neurotoxicity. **Cerebrovasc. Brain Metab. Ver.**, v. 2, p.105-147, 1990.
- CHOI, D. W., MAULUCCI-GEDDE, M., KRIEGSTEIN, A. R. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. **J. Neurosci.**, v. 7, p. 357-368, 1987.
- CHOI, D.W., MONYER, H., GIFFARD, R.G., GOLDBERG, M.P., CHRISTINE, C.W. Acute brain injury, NMDA receptors, and hydrogen ions: observations in cortical cell cultures., **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 268, p. 501-504, 1990.
- CHOI, O. H., SHAMIM, M. T., PADGETT, W. L., DALLY, J. W. Caffeine and theophylline analogues: correlation of behavioral effects with activity as adenosine receptor antagonists and as phosphodiesterase inhibitors. **Life Sci.**, v. 43, p. 387-398, 1988.
- CHUTE, D. L., VILLIGER, J. W., DRAGUNOW, M. Evaluating cyclic AMP mediation of memory. **Soc. Neurosci. Abst.**, v. 6, p. 111, 1980.
- CIABATTONI, G. & WENNMALM, A. Adenosine-induced coronary release of prostacyclin at normal and low pH in isolated heart of rabbit. **Br. J. Pharmacol.**, v. 85, p. 557-563, 1985.
- CIANI, E., GRONENG, L., VOLTATTORNI, M., ROLSETH, V., CONTESTABILE, A., PAULSEN, R.E. Inhibition of free radical production or free radical scavenging protects from the excitotoxic cell death mediated by glutamate in cultures of cerebellar granule neurons. **Brain Res.**, v. 728, p. 1-6, 1996.
- CIUFFETTI, G., PALTRICCIA, R., LOMBARDINI, R., LUPATTELLI, G., PASQUALINI, L., MANNARINO, E. Treating peripheral arterial occlusive arterial disease: pentoxifylline vs exercise. **Int. Angiol.**, v. 13, p. 33-39, 1994.
- CLIFTON, G. L., LYETH, B. G., JENKINS, L. W., TAFT, W. C., DeLORENZO, R. J., HAYES, R. L. Effect of D- $\alpha$ -tocopheroyl succinate and polyethylene glycol on performance tests after fluid percussion brain injury. **J. Neurotrauma**, v. 6, p. 71-81, 1989.

- CLUGNET, M. C. & LEDOUX, J. E. Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of the medial geniculate body. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 2818-2824, 1990.
- COHEN, M. M., HARRISON, W., GRAY, R., BECKER, R. The effect of pentoxifylline on cerebral ischemia and amino acid incorporation into gerbil brain. **Proc. of the Annual Meeting of the American Neurology Association**, St Louis, 1979.
- COLLINGRIDGE, G. L., KEHL, S. L., McLENNAN, H. Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. **J. Physiol.**, v. 334, p. 34-46, 1983.
- COLTON, C. A. & GILBERT, D. L. production of superoxide anion by a CNS macrophage, the microglia. **FEBS Lett.**, v. 223, p. 284-288, 1987.
- COOPER, J. R., BLOOM, F. L., ROTH, R. H. Cellular Mechanisms in Learning and Memory. In **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, seven edition, Oxford University Press, New York, 1996, p. 459-479.
- COTMAN, C. W., MONAGHAN, D. T., GANONG, A. H. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. **Annu Rev Neurosci.**, v. 11, p.61-80, 1988.
- COYLE, J. T. & SCHWARCZ, R. Lesion of striatal neurons with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. **Nature (London)**, v. 263, p. 244-246, 1976.
- COYLE, J. T., PRICE, D. L., DeLONG, M. R. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. **Science**, v. 219, p. 1184-1190, 1983.
- DA CUNHA, C., HUANG, C. H., WALZ, R., DIAS, M., KOYA, R., BIANCHIN, M., PEREIRA, M. E., IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H. Memory facilitation by post-training intraperitoneal, intraventricular and intra-amygdala injection of Ro5-4864. **Brain Res.**, v. 544, p.133-136, 1991.

- DALMAZ, C., INTRONIONI-COLLISON, I.B., McGAUGH, J.L. Noradrenergic and cholinergic interactions in the amygdala and the modulation of memory storage. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 167-174, 1993.
- DALY, J. W. Adenosine receptors: target sites for drugs. **J. Med. Chem.**, v. 25, p. 197-207, 1982.
- DALY, J. W., BRUNS, R. F., SNYDER, S. H. Adenosine receptors in the central nervous system: relationship to the central actions of methylxanthines. **Life Sci.**, v. 28, p. 2083-2097, 1981.
- DAVIDSON, N., Glutamate and Aspartate. In **Neurotransmitter Amino Acids**, Academic Press, New York, 1976, p.6-38.
- DAVIES, J., FRANCIS, A.A., JONES, A.W., WATKINS, J.C. 2-Amino-5-phosphonovalerate (2-APV), a potent and selective antagonist of amino acid-induced and synaptic excitation. **Neurosci. Lett.**, v. 21, p. 77-81, 1981.
- DAVIS, C. W. Assessment of selective inhibition of rat cerebral cortical calcium-independent and calcium-dependent phosphodiesterases in crude extracts using deoxycyclic AMP and potassium ions. **Bioch. Biophys. Acta**, v. 797, p. 354-362, 1984.
- DAVIS, K. L., HAROUTUNIAN, V. Strategies for the treatment of Alzheimer's disease. **Neurology**, v. 43[supl. 4], p. S52-S55, 1993.
- DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. **Annual Rev. Neurosci.**, v. 15, p. 353-375, 1992.
- DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. Neurotransmission in the rat amygdala related to fear and anxiety. **Trends in Neurosci.**, v.17, p. 208-214, 1994.
- DAVIS, S., BUTCHER, S.P., MORRIS, R.G. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 21-34, 1992.
- DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., SNYDER, S. H. Molecular mechanisms of nitric oxide actions in the brain. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 738, p. 76-85, 1994.

- DAWSON, T. M. & SNYDER, S. H. Gases as biological messenger: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 5147-5159, 1994.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T. M., BARTLEY, D. A., UHL, G. R., SNYDER, S. H. Mechanisms of nitric oxide mediated neurotoxicity in primary brain cultures. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 2651-2661, 1993.
- DAWSON, V.L., DAWSON, T. M., LONDON, E. D., BREDT, D. S., SNYDER, S. H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6368-6371, 1991.
- DE KLOET, E. R., ROSENFELD, P., VAN EEKELEN, J. A. M., RATKA, A., JOËLS, M., LEVINE, S. Long-term effect of glucocorticoids on brain function. In R. C. A. Fredrickson, J. L. McGaugh & D. L. Felten (Eds.), **Peripheral signalling of the brain**, Toronto: Hogrefe & Huber, 1991, p. 225-242.
- DE LEON, M. J., GOLOMB, J., GEORGE, A., G., CONVIT, A., TARSHISH, C. Y., McRAE, T., DE SMITH, G., FERRIS, S. H. The radiologic prediction of Alzheimer's disease: The atrophic hippocampal formation. **Am. J Neuroradiology**, v. 14, p. 897-906, 1993.
- D'MELLO, S. R., GALLI, C., CIOTTI, T., CALISSANO, P. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 10989-10993, 1993.
- DE TOLEDO-MORRELL, L., MORRELL, F., FLEMING, S., COHEN, M. Pentoxifylline reverses age-related deficits in spatial memory. **Behav. Neural Biol.**, v. 42, p. 1-8, 1984.
- DE WIED, D. & BOHUS, B. Modulation of memory processes by neuropeptides of hypothalamic-neurohypophyseal origin. In M. A. B. Brazier (Ed.), **Brain mechanisms in memory and learning: From the single neuron to man**, New York: Raven, 1979, p. 139-150.
- DE WIED, D. & VERSTEIG, D. H. G. Neurohypophysial peptides and memory. **Fedn. Proc.**, v. 38, p. 2348-2354, 1979.

- DECKER, M. Cholinergic/adrenergic interactions and memory. In Levin E. D., Decker, m. w., Larry, l. b. (Eds.), **Neurotransmitter interactions and cognitive function**. Birkhauser, Boston, MA, 1993, p. 78-90.
- DECKER, M. W. & MAJCHRZAK, M. J. Effects of systemic and intracerebroventricular administration of mecamylamine, a nicotinic cholinergic antagonist, on spatial memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 107, p. 530-534, 1992.
- DECKER, M. W., MAJCHRZAK, M. J. Effects of central nicotinic cholinergic receptor blockade produced by chlorisondamine on learning and memory performance in rats. **Behav. Neural Biol.**, v. 60, p.163-171, 1993.
- DECKER, M. W., MAJCHRZAK, M. J., ARNERIC, S. P. Effects of lobeline, a nicotinic receptor agonist, on learning and memory. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, p. 571-576, 1993.
- DECKER, M. W., McGAUGH, J. L. The role of interactions between the cholinergic system and other neuromodulatory systems in learning and memory. **Synapse**, v. 7, p. 151-168, 1991.
- DE LEON, M. J., GOLOMB, J., GEORGE, A. E., CONVIT, A., TARSHISH, C. Y., McRAE, T., DE SANTI, S., SMITH, G., FERRIS, S. H., NOZ, M. *et al.* The radiologic prediction of Alzheimer disease: the atrophic hippocampal formation. **Am. J. Neuroradiol.**, v. 14, p. 897-906, 1993.
- DEL RIO, J. A., HEINRICH, B., SORIANO, E. *et al.* Proliferation and differentiation of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive glial cells in organotypic slice cultures of rat hippocampus. **Neurosci.**, v. 43, p. 335-347, 1991.
- DeNOBLE, V. J., REPETTI, S. J., GELPKE, L. W., WOOD, L. M., KEIM, K.L. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. **Pharmac. Biochem. Behav.**, v. 24, p. 1123-1128, 1986.

- DI PERRI, T., CARANDENTE, O., VITTORIA, A., GUERRINI, M., MESSA, G. L. Studies of the clinical pharmacology and therapeutic efficacy of pentoxifylline in peripheral obstructive arterial disease. **Angiology**, v. 35, p. 427-435, 1984.
- DINARELLO, C. A. Pathogenesis of fever in man. **N. Engl. J. Med.**, v. 298, p. 607-612, 1978.
- DINGLELINE, R., MCBAIN, C.nJ., MCNAMARA, J. O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. **Trends Pharm. Sci.**, v. 11, p. 379, 1990.
- 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.**, v. 3(10), p. 1963-70, 1983.
- DORMANDY, J., NASH, G. B., LOOSEMORE, T *et al.* Effects of acute Trental infusion on white blood cell rheology in patients with critical leg ischemia. In: Hakim J., Novick Jr W. J. (Eds). **Proceedings of the Workshop on Pentoxifylline ans analogues: effects on leucocyte function.**, Saint Paul-de-Vence, France, Basel:Karger, 1989, p. 203-205.
- DUGGAN, A.W. The differential sensitivity to L-glutamate and L-aspartate of spinal interneurons and Renshaw cells. **Exp. Brain Res.**, v.19, p. 522-528, 1974.
- DUNN, A. J. Neurochemistry of learning and memory: An evaluation of recent data. **Ann. Rev. Psychol.**, v. 31, p. 343-390, 1980.
- DUNNETT, S. B., WAREHAM, A. T., TORRES, E. M. Cholinergic blockade in prefrontal cortex and hippocampus disrupts short-term memory in rats. **Neuroreport**, v. 1, p. 61-64, 1990.
- DYKENS, J. A., STERN, A., TRENKNER, E. Mechanism of kainate toxicity to cerebellar neurons in vitro is analogous to reperfusion tissue injury. **J. Neurochem.**, v. 49, p. 1222-1228, 1987.



- ENDRES, S., FÜLLE, H. J., SINHA, B. *et al.* Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-1 $\beta$  by human mononuclear cells. **Immunology**, v. 172, p. 56-60, 1991.
- EGAWA, T., MISHIMA, K., MATSUMOTO, Y., IWASAKI, K., IWASAKI, K., FUJIWARA, M. Rolipram and its optical isomers, phosphodiesterase 4 inhibitors, attenuated the scopolamine-induced impairments of learning and memory in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 75, p. 275-281, 1997.
- EGEBJERG, J., BETTLER, B., HERMANS-BORGMEYER, I., HEINEMANN, S. Cloning of a cDNA for a glutamate receptor subunit activated by kainate but not AMPA. **Nature**, v. 351, p. 745-747, 1991.
- EHRLY, A. M. & SAEGER-LORENZ, K. Influence of pentoxifylline on muscle tissue oxygen tension (pO<sub>2</sub>) of patients with intermittent claudication before and after pedal ergometer exercise. **Angiology**, v. 38, p. 93-100, 1987.
- ELLMAN, G. L., COURTNEY, K. D., ANDRES JR, V., FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 7, p. 88-95, 1961.
- ENDRES, S., FÜLLE, H. J., SINHA, B. *et al.* Cyclic nucleotides differentially regulate the synthesis of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1-beta by human mononuclear cells. **Immunology**, v. 72, p. 56-60, 1991.
- ENGELSEN, B. Neurotransmitter glutamate: its clinical importance. **Acta Neurol. Scand.**, v. 74(5), p.337-355, 1986.
- EVANS, M. C., GRIFFITHS, T., MELDRUM, B. S. Kainic acid seizures and the reversibility of calcium loading in vulnerable neurons in the hippocampus. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.**, v. 10, p. 285-302, 1984.
- EVANS, R. H., FRANCIS, A. A., JONES, A. W., SMITH, D. A., WATKINS, J. C. The effects of a series of omega-phosphonic alpha-carboxylic amino acids on electrically evoked and excitant amino acid-induced responses in isolated spinal cord preparations. **Br. J. Pharmacol.**, v. 75, p. 65-75, 1982.

- EVANS, S. M., PINTO PEREIRA, L. M., ADDAE, J. I. Neuroprotection by caffeine and pentoxifylline during experimental cerebral ischaemia. **West Indian Med. J.**, v. 48, p. 23-25, 1999.
- FADEN, A. I., DEMEDIUK, P., PANTER, S.S., VINK, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. **Science**, v. 244, p. 798-800, 1989.
- FARRAJOTA, A., SOUSA LUZ, E., ALBINO P., MEIRELES, N. Isquemia cronica dos membros inferiores. Grau III/IV de Leriche-Fontaine em doentes diabéticos ensaio com a pentoxifilina. **J. Soc. Sienc. Med. Lisboa**, v. 153, p. 53-66, 1989.
- FAVARON, M., MANEV, H., ALHO, H., BERTOLINO, M., FERRET, B., GUIDOTTI, A., COSTA, E. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 7351-7355, 1988.
- FERRANTE, R. J., KOWALL, N. W., BEAL, M. F., RICHARDSON, E. P. JR, BIRD, E. D., MARTIN, J. B. Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. **Science**, v. 230, p. 561-573, 1985.
- FERRARA, N., OUSLEY, F., GOSPODAROWICZ, D. Bovine brain astrocytes express basic fibroblast growth factor, a neurotropic and angiogenic mitogen. **Brain Res.**, v. 462, p. 223-232, 1988.
- FERREIRA, M. B. C., WOLFMAN, C., MEDINA, J. H., IZQUIERDO, I. Late posttraining memory processing by entorhinal cortex: Role of NMDA and GABAergic receptors. **Pharmacol. Bioch. Behav.**, v. 41, p. 767-771, 1992a.
- FERREIRA, M. B. C., WOLFMAN, C., WALZ, R., Da SILVA, R. C., ZANATTA, M. S., MEDINA, J. H., IZQUIERDO, I. NMDA-dependent, GABA-A-sensitive role of the entorhinal cortex in post-training memory processing. **Behav. Pharmacol.**, v. 3, p. 387-391, 1992b.
- FEUERSTEIN, G., WANG, X., BARONE, F. C. Cytokines in brain ischemia- the role of TNF alpha. **Cell Mol. Neurobiol.**, v. 18, p. 695-701, 1998.

- FIBIGER, H. C. Cholinergic mechanisms in learning, memory and dementia: a review of recent evidence. **Trends Neurosci.**, v. 14, p. 220-223, 1991.
- FIBIGER, H. C. Cholinergic replacement strategies in Alzheimer's disease: the postsynaptic dilemma. Commentary on Dawson *et al.*, "Pharmacological mechanisms and animal models of cognition", **Behav. Pharmacol.**, v. 3, p. 299-300, 1992.
- FJODOROV, N. A., TERMILTSCHENKO, G. V., VINNIZKIJ, L. I., MALYCHINA, L. S., KRASJUKOVA, L. I. et al. Clinical and experimental investigations into the role of 3',5'cyclic guanosine monophosphate (cGMP) in the mechanism of action of pentoxifylline. **Pharmatherapeutica**, v. 2(1), p. 17-20, 1978.
- FLETCHER, M. A., McKENNA, T. M., OWENS, E. H., NADKARNI, V. M. Effects of *in vivo* pentoxifylline treatment on survival and *ex vivo* vascular contractility in a rat lipopolysaccharide shock model. **Circ. Shock**, v. 36, p. 74-80, 1992.
- FOLNEGOVIC-SMALE, V., KNEZEVIC, S., BOKONJIC, R. *et al.* European pentoxifylline multi-infarct dementia trial. The EPMID study [abstract]. **26<sup>th</sup> Danube Symposium for Neurological Sciences**, sept 30-oct-2, Innsbruck, 1993.
- FONNUM, F. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **J. Neurochem.**, v. 42, p. 1-11, 1984.
- FONTANA, A., FIERZ, W., WEKERLE, H. Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. **Nature**, v. 307, p. 273-276, 1984.
- FOSSAT, C., FABRE, D., ALIMI, Y., BIENVENU., J., AILLAUD, M. F., LENOBLE, M., JUHAN-VAGUE, I., JUHAN, C.. Leukocyte activation study during occlusive arterial of the lower limb: effect of pentoxifylline. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25, p. 96-100, 1995.

- FRAMPTON, J. E. & BROGDEN, R. N. Pentoxifylline (oxpentifylline). A review of its therapeutic efficacy in the management of peripheral vascular and cerebrovascular disorders. **Drugs Aging**, v. 7, p. 480-503, 1995.
- FRANDBSEN, A. & SCHOUSBOE, A. Dantrolene prevents glutamate cytotoxicity and calcium release from intracellular stores in cultured cerebral cortical neurons. **J. Neurochem.**, v. 56, p. 1075-1078, 1991.
- FRANZINI, E., SELLA, H., BABIN-CHEVAYE, C. *et al.* Effects of pentoxifylline on the adherence of polymorphonuclear neutrophils to oxidant-stimulated human endothelial cells: involvement of cyclic AMP. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25 (Suppl. 2), p. 92-95, 1990.
- FRASER, C. M., FISHER, A., COOKE, M. J., THOMPSON, I. D., STONE, T. W. The involvement of adenosine receptors in the effect of dizocilpine on mice in the elevated plus-maze. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 7, p. 267-273, 1997.
- FREDHOLM, B. B. Theophylline actions on adenosine receptors. **Eur. J. Respir. Dis.**, v. 109, p. 29-36, 1980.
- FREDHOLM, B. B., ABBRACCHIO, M. P., BURNSTOCK, G., DALY, T. K., HARDEN, T. K., JACOBSON, K. A., LEFF, P., WILLIAMS, M. Nomenclature and classification of purinoceptors. **Pharmacol. Rev.**, v. 46, p. 143-156, 1994.
- FU, W. M. Potentiation of acetylcholine responses in *Xenopus* embryonic muscle cells by dibutyl cAMP. **Pflugers Arch.**, v. 425, p. 439-445, 1993.
- FUKUDA, I., YOSHIDA, T., YORITSUNE, H., KISO, T., KONISHI, S. ET AL. Studies on the hemorheological factors in ischemic heart disease and cerebrovascular disorders. **Bull. Osaka Medical School**, v. 24, p. 83-91, 1978.
- FULTON, B. P., BURNE, J. F., RAFF, M. C. Visualization of O-2A progenitor cells in developing and adult rat optic nerve by quisqualate-stimulated cobalt uptake. **J. Neurosci.**, v. 12, p. 4816-4833, 1992.
- GARDNER-MEDWIN, A. R. Analysis of potassium dynamics in mammalian brain tissue. **J. Physiol.**, v. 335, p. 393-426, 1983.

- GARRETT, B. E. & GRIFFITHS, R. R. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 57, p. 533-541, 1997.
- GARRONE, B., LUPARINI, M. R., TOLU, L., MAGNANI, M., LANDOLFI, C., MILANESE, C. Effect of the subchronic treatment with the acetylcholinesterase inhibitor heptastigmine on central cholinergic transmission and memory impairment in aged rats. **Neurosci. Lett.**, v. 245, p. 53-57, 1998.
- GARTHWAITE, G & GARTHWAITE, J. Cyclic GMP and cell death in rat cerebellar slices. **Neuroscience**, v. 26, p. 321-326, 1988.
- GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci.**, v. 14, p. 60-67, 1991.
- GARTHWAITE, J., GARTHWAITE, G., PALMER, R. M., MONCADA, S. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 172, p. 413-416, 1989.
- GEINISMAN, Y. & BONDAREFF, W. Decrease in the number of synapses in the senescent brain: A quantitative electron microscopic analysis of the dentate gyrus molecular layer in the rat. **Mechanisms of Aging and Dev.**, v. 5, p. 11-23, 1976.
- GILL, R., NORDHOLM, L., LODGE, D. The neuroprotective actions of 2,3-dihydro-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(f)quinoxaline (NBQX) in a rat focal ischaemia model. **Brain Res.**, v. 580, p. 35-43, 1992.
- GINCHERMAN, E. Z., TITOVA, S. MASOVECKIJ, A. G. Use of antiaggregating and haemostatic drugs in the treatment of diabetic retinopathy. **Problemy Endokrinologii (Moskva)**, v. 28, p. 17-22, 1982.
- GIRAUD, F. & CLARET, M. Lack of effect of pentoxifylline on membrane lipid order and ion transports in human red cells. **Scand. J. Clin. Labor. Invest.**, v. 41(156), p. 283-284, 1981.
- GIULIAN, D. & BAKER, T. J. Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 2163-2178, 1986.

- GIULIAN, D. & ROBERTSON, C. Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord. **Ann. Neurol.**, v. 27, p. 33-42, 1990.
- GIULIAN, D. Ameboid microglia as effectors of inflammation in the central nervous system. **J. Neurosci. Res.**, v. 18, p. 155-171, 1987.
- GIULIAN, D., VACA, K., CORPUZ, M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. **J. Neurosci.**, v. 13, p. 29-37, 1993.
- GOLD, P. E. Modulation of emotional and nonemotional memories: Same pharmacological systems, different neuroanatomical systems. In J. L. McGaugh, N. Weinberger & G. Lynch (Eds.). **Brain and memory: Modulation and mediation of neural plasticity**, New York: Oxford University Press, 1995, p. 41-74.
- GOLD, P. E. & McCARTY, R. C. Stress regulation of memory processes. Role of peripheral catecholamines and glucose. In M. J. Friedman, D. S. Charney & A. Y. Deutch (Eds.), **Neurobiological and clinical consequences of stress**, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1995, p. 151-162.
- GOLD, P. E. An integrated memory regulation system: From blood to brain. In R. C. A. Fredrickson, J. L. McGaugh & D. L. Felten (Eds.), **Peripheral signalling of the brain**, Toronto: Hogrefe & Huber, 1991, p. 391-419.
- GOLD, P. E., DELLANOY, R. L., MERRIN, J. Modulation of long-term potentiation by peripherally administered amphetamine and epinephrine. **Brain Res.**, v. 305, p. 103-107, 1984.
- GOLTSEVA, S. V. Comparative assesment of efficacy of various methods for treatment of diabetic retinopathies. **Optalmologii Zhurnal**, v. 38, p. 36-38, 1983.
- GOTO, M., DEMURA, N., SAKAGUCHI, T. Effects of propentofylline on disorder of learning and memory in rodents. **Jpn J. Pharmacol.**, v. 45, p. 373-378, 1987.

- GOTTFRIES, C. G., ADOLFSSON, R., ACQUILONIUS, S. M. Biochemical changes in dementia disorders of the Alzheimer type (AD/SDAT). **Neurobiol. Aging**, v. 4, p. 261-271, 1983.
- GRANT, S. G. N. & SILVA, A. J. Targeting learning. **Trends in Neurosci.**, v. 17, p. 71-75, 1994.
- GRECKSCH, G. & MATTEHIES, H. J. Involvement of hippocampal dopaminergic receptors in memory consolidation in rats. In C. Ajmone-Marsan & H. Mathies (Eds.), **Neuronal plasticity and memory formation**, New York: Raven, 1982, p. 353-357.
- GREEN, L. C., TANNENBAUM, S. R., GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.
- GREENAMYRE, J. T., YOUNG, A. B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, v. 10, p. 593-602, 1989.
- GREENGARD, P. Possible role for cyclic nucleotides and phosphorylated membrane proteins in postsynaptic actions of neurotransmitters. **Nature (London)**, v. 260, p. 101-108, 1976.
- GRIGORYAN, G., HODGES, H., MITCHELL, S., SINDEN, J. D., GRAY, J. R. 6-OHDA lesions of the nucleus accumbens accentuate memory deficits in animals with lesions to the forebrain cholinergic projection system: Effects of nicotine administration on learning and memory of the water maze. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 65, p.135-153, 1996.
- GUSTAFSSON, B. & WIGSTROM, H. Physiological mechanisms underlying long-term potentiation. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 156-162, 1988.
- HALDEMAN, S. & MCLENNAN, H. The antagonist action of glutamic acid diethyl ester towards amino acid-induced and synaptic excitations of central neurons. **Brain Res.**, v. 45, p. 393-400, 1972.
- HALDEMAN, S., HUFFMAN, R.D., MARSHALL, K.C. & MCLENNAN, H. The antagonism of the glutamate-induced and synaptic excitations of thalamic neurones. **Brain Res.**, v. 39, p. 419-425, 1972.

- HALL, E. D., BRAUGHLER, J. M., YONKERS, P. A., SMITH, S. L., LINSEMAN, K. L., MEANS, E. D., SCHERCH, H. M., VON VOIGTLANDER, P. F., LAHTI, R. A., JACOBSEN, E. J. U-78517F: a potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 258, p. 688-694, 1991.
- HALLE, J. N., KASPER, C. E., GIDDAY, J. M., KOOS, B. J. Enhancing adenosine A1 receptor binding reduces hypoxic-ischemic brain injury in newborn rats. **Brain Res.**, v. 759, p. 309-312, 1997.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. M. **Free Radicals in Biology and Medicine**, Clarendon Press, Oxford, 1985.
- HAMMERSCHMIDT, D. E., KOTASEK, D., McCARTHY, T. *et al.* Pentoxifylline inhibits granulocyte and platelet function, including granulocyte priming by platelet activating factor. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 112, p. 254-263, 1988.
- HAROUTUNIAN, V., BARNES, E., DAVIS, K. L. Cholinergic modulation of memory in rats. **Psychopharmacology**, v. 87, p. 266-271, 1985.
- HARRIS, E. W. & COTMAN, C. W. Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber response is not blocked by *N*-methyl-D-aspartate antagonist. **Neurosci. Lett.**, v. 70, p. 132-137, 1986.
- HARRIS, E. W., GANONG, A. H., COTMAN, C. W. Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors. **Brain Res.**, v. 323, p. 132-137, 1984.
- HARTMANN, A. Effect of pentoxifylline on regional cerebral blood flow in patients with cerebral vascular disorders. **Eur. Neurol.**, v. 22(1), p. 108-115, 1983.
- HARTMANN, J. F., BECKER, R. A., COHEN, M. M. EffectS of pentoxifylline on cerebral ultrastructure of normal and ischemic gerbils. **Neurol.**, v. 27, p. 77-84, 1977.



- HARWART, D. The treatment of chronic cerebrovascular insufficiency. A double-blind study with pentoxifylline (Trental 400). **Curr. Med. Res. and Opinion**, v. 6, p. 73-84, 1979.
- HATTI, H. Modification of glutamate receptor channels: molecular mechanisms and functional consequences. **Naturwissenschaften**, 1990.
- HAVIV, R. & STEIN, R. Nerve growth factor inhibits apoptosis induced by tumor necrosis factor in PC12 cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 55, p. 269-277, 1999.
- HAWKINS, R. D., ABRAMS, T. W., CAREW, T. J., KANDEL, E. R. A cellular mechanism of classical conditioning in *Aplysia*: Activity-dependent amplification of presynaptic facilitation. **Science**, v. 219, p. 400-406, 1983.
- HAYES, R.L., JENKINS, L.W., LYETH, B.G. Neurotransmitter-mediated mechanisms of traumatic brain injury; acetylcholine and excitatory amino acids. **J. Neurotrauma**, v. 9, p. S173-S187, 1992.
- HAYASHI, S., OZAWA, H. Studies on 3,7-dimethyl-1-(5-oxo-hexyl)-xanthine(BL 191). 1. Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase (PDE) and the inhibitory effect of BL 191 on PDE in rat brain and heart. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)**, v. 22, p.587-593, 1974.
- HEBB, D. O. **The Organization of Behavior**, Wiley, New York, 1949.
- HEIDEMANN, H. T., GERILLENS, J. F., JACKSON, E. K., BRANCH, R. Effect of aminophylline on renal vasoconstriction produced by amphotericin B in rat. **Arch. Pharm.**, v. 324, p. 148-153, 1983.
- HEIDEMANN, H. T., MULLER, S., MERTINS, L., STEPAN, G., HEIDMANN, K. OHNHAUS, E. E. Effect of aminophylline on cisplatin nephrotoxicity in the rat. **Brit. J. Pharmacol.**, v. 97, p. 31-37, 1989.
- HELDIN, C. H., WESTERMARK, B., WATESON, A. Special receptors for PDGF on cells from connective tissue and glia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 78, p. 3664-3668, 1981.
- HENDELES, L. & WEINBERGER, M. Theophylline: "State of the art" review. **Pharmacotherapy**, v. 3, p. 2-24, 1983.

- HERGER, R. Zum stellenwert der mikrozkulation in der behandlung des ulcus cruris. **Therapiewoche**, v. 36, p. 3818-3828, 1986.
- HIBBS, J. B. JR, VAVRIN, Z., TAINTOR. R. R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. **J. Immunol.**, v. 138, p.550-565, 1987.
- HILLERED, L., HALLSTROM, A., SEGERSVARD, S., PERSSON, L., UNGERSTEDT, U. Dynamics of extracellular metabolites in the striatum after middle cerebral artery occlusion in the rat monitored by intracerebral microdialysis. **Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 9, p. 607-616, 1989.
- HOLLMANN, M., HARTLEY, M., HEINEMANN, S. Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition, **Science**, v. 252, p. 851-854, 1991.
- HOPKINS, W. F. & JOHNSTON, D. Noradrenergic enhancement of long-term potentiation at mossy fiber synapses in the hippocampus. **J. Neurophysiol.**, v. 59, p. 667-687, 1988.
- HOU, X., BAUDRY, N., LENOBLE, M. *et al.* Leukocyte adherence in an ischemic music perfused by a collateral circulation. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25, p. 119-123, 1995.
- HUANG, Y. -Y., LI, X.-C., KANDEL, E.R. cAMP contributes to mossy fiber LTP by initiating both a covalently mediated early phase and a macromolecular-synthesis dependent late phase. **Cell**, v. 79, p. 69-79, 1994.
- HYMAN, B. T., van HOESEN, G. W., DAMASIO, A. R. memory-related neural systems in Alzheimer's disease: Na anatomic study. **Neurology**, v. 40, p. 1721-1730, 1990.
- IGNARRO, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annu. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 535-560, 1990.
- IMANISHI, T., SAWA, A., ICHIMARU, Y., MIYASHIRO, M., KATO, S., YAMAMOTO, T., UEKI, S. Ameliorating effects of rolipram on

- experimentally induced impairments of learning and memory in rodents. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 321, p. 273-278, 1997.
- INGERSLEV, J., MOURIKEN, G., STENBJERG, S. Pentoxifylline does not interfere with stable coumarin anticoagulant therapy: a clinical study. **Pharmatherapeutica**, v. 4, p. 595-600, 1986.
- INTROINI-COLLISON, I. B., DALMAZ, C., McGAUGH, J. L. Amigdala  $\beta$ -noradrenergic influences on memory storage involve cholinergic activation. **Neurobiol. Learn. Memory**, v. 65, p. 57-64, 1996.
- ISHIZAKA, A., WU, Z. H., STEPHANS, K. E., HARADA, H., HOGUE, R. S., O'HANLEY, P. T., RAFFIN, T. A. Attenuation of acute lung injury in septic guinea pig by pentoxifylline. **Amer. Rev. Resp. Dis.**, v. 138, p. 376-382, 1988.
- IWASAKI, K., MATSUMOTO, Y., FUJIWARA, M. Effect of nebracetam on the disruption of spatial cognition in rats. **Jpn. J. Pharmacol.**, v. 58, p. 117-126, 1992.
- IZQUIERDO, I. Different forms of post-training memory processing. **Behav. Neur. Biol.**, v. 51, p. 171-202, 1989.
- IZQUIERDO, I. Role of NMDA receptors in memory. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 128-129, 1991.
- IZQUIERDO, I. Long-term potentiation and the mechanisms of memory. **Drug Dev. Res.**, v. 30, p. 1-17, 1993.
- IZQUIERDO, I. Pharmacology evidence for a role of long-term potentiation in memory. **FASEB**, v. 8, p. 1139-1145, 1994.
- IZQUIERDO, I., BIANCHIN, M., BUENO E SILVA, M., ZANNATA, M. S., WALZ, R., Da SILVA, R. C., RUSCHEL, A., PACZKO, N., MEDINA, J. H. CNQX infused into rat hippocampus or amygdala disrupts the expression of memory of two different tasks. **Behav. Neural Biol.**, v. 59, p. 1-4, 1993a.
- IZQUIERDO, I. & CHAVES, M. L. F. Synaptic mechanisms in hippocampus, amygdala, septum and entorhinal cortex involved in memory formation, storage

- and expression. In: Benninger R., Archer T. & Palomo T. (Eds.), **Dopamine Disease States**, Complutense, Madrid, v. 1996, p. 389-406.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Correlation between the pharmacology of long-term potentiation and the pharmacology of memory. **Neurobiol. Learn. Mem.** v 63, p. 19-32, 1995.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. GABA-A receptor modulation of memory: The role of endogenous benzodiazepines. **Trends in Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 260-265, 1991.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. Long-term potentiation and neuromodulator- and hormone-dependent processes play a role in declarative memory. In L. McGaugh & K. Ishikawa (Eds.), **Brain processes and memory**, Amsterdam: Elsevier, North-Holland, 1996, p. 25-38.
- IZQUIERDO, I. & MEDINA, J. H. The biochemistry of memory formation and its regulation by hormones and neuromodulators. **Psychobiology**, v. 25, p. 1-9, 1997.
- IZQUIERDO, I., Da CUNHA, C., ROSAT, R., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M. B. C., MEDINA, J. H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of rats. **Behav. and Neural. Biol.**, v. 58, p. 16-26, 1992.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., BIANCHIN, M., WALZ, R., ZANATTA, M. S., Da SILVA, R. C., BUENO E SILVA, M., RUSCHEL, A. C., PACZKO, N. Memory processing by the limbic system: Role of specific neurotransmitter systems. **Behav. Brain Res.**, v. 58, p. 91-98, 1993c.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., DA CUNHA, C., WOLFMAN, C., JERUSALINSKY, D., FERREIRA, M. B. Memory modulation by brain benzodiazepines. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 865-881, 1991.
- IZQUIERDO, I., MEDINA, J. H., VIANNA, M. R., IZQUIERDO, L. A., BARROS, D. M. Separate mechanisms for short- and long-term memory. **Behav. Brain Res.**, v. 103, p. 1-11, 1999.

- IZQUIERDO, I., VENDITE, D. A., SOUZA, D. A., DIAS, R. D., CARRASCO, M. A., PERRY, M. L. S. In R. Caputo & C. Ajmone-Marsan (Eds.), **Neural transmission, learning and memory**, New York: Raven., p. 221-235.
- IZQUIERDO, J. A. & CARDINALI, D. P. Effect of caffeine, aminophylline and pentoxifylline on memory processes in mice. **Acta Physiologica Latino Americana**, v. 31, p. 207-209, 1981.
- IZUMI, Y., BENZ, A. M., CLIFFORD, D. B., ZORUMSKI, C. R. Nitric oxide inhibitors attenuate N-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices [published erratum appears in *Neurosci Lett* 1992 Jun 8;140(1):135], **Neurosci. Lett.**, v. 135, p.227-230, 1992.
- IZUMO, T., SUZUKI, G., CHEN, Z., FUJII, Y., KAMEI, C. Effects of certain cerebral circulation activating drugs on regional cerebral blood flow in rats. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 21, p. 279-283, 1999.
- JAVITT, D. C. & ZUKIN, S. R. Biexponential kinetics of [3H]MK-801 binding: evidence for access to closed and open N-methyl-D-aspartate receptor channels. **Mol. Pharmacol.**, v. 35, p. 387-393, 1989.
- JENKINS, L.W., LYETH, B. G., LEWELT, W., MOSZYNSKI, K., DEWITT, D. S., BALSTER, R. L., MILLER, L. P., CLIFTON, G. L., YOUNG, H. F., HAYES, R. L. Combined pretrauma scopolamine and phencyclidine attenuate post-traumatic increased sensitivity to delayed secondary ischemia. **J. Neurotrauma**, v. 5, p. 275- 287, 1988.
- JESBERGER, J. A. & RICHARDSON, J. S. Oxygen free radicals and brain dysfunction. **Int. J. Neurosci.**, v. 57, p. 1-17, 1991.
- JOHNS, L. D., BABCOCK, G., GREEN, D. FREEDMAN, M., SRIRAM, S., RANSOHOFF, R. Transforming growth factor-B1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brain-stem astrocyte primary cultures. **Brain Res.**, v. 585, p. 229-236, 1992.
- JOHNSON, J. W. & ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, v. 325, p. 529-531, 1987.

- JOHNSON, R. Effect of pentoxifylline on red cell flexibility and cation transport in healthy subjects and patients with hereditary spherocytosis. **Scand. J. of Haematol.**, v. 23, p. 81-87, 1979.
- JOHNSTON, G. A. R., CURTIS, D. R., DAVIES, J., MCCULLOCH, R. M. Spinal interneurone excitation by conformationally restricted analogues of L-glutamic acid. **Nature**, v. 248, p. 804-805, 1974.
- JOHNSTON, R. B., GODZIK, C. A., COHN, Z. A. Increased superoxide anion production by immunologically activated and activated and chemically elicited macrophages. **J. Biol. Chem.**, v. 148, p. 115-127, 1978.
- KALSNER, S., FREW, R. D., SMITH, G. M. Mechanism of methylxanthine sensitization of norepinephrine responses in a coronary artery. **Am. J. Physiol.**, v. 228, p. 1702-1707, 1975.
- KAMPHUIS, J., SMITS, P., THIEN, T. Vascular effects of pentoxifylline in humans. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 24, p. 648-654, 1994.
- KANDEL, E. R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. Cellular mechanisms of learning and memory, In: **Essentials of neural science and behavior**, erick R. Kandel (ed.), Appleton & Lange, Stamford, USA, 1995, p. 682.
- KAPLAN, G. B., GREENBLATT, D. J., LeDUC, B. W., THOMPSON, M. L., SHADER, R. I. Relationship of plasma and brain concentrations of caffeine and metabolites to benzodiazepine receptor binding and locomotor activity. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 248, p. 1078-1083, 1989.
- KARADSHEH, N., KUSSIE, P., LINTHICUM, D. S. Inhibition of acetylcholinesterase by caffeine, anabasine, methylpyrrolidine and their derivatives. **Toxicol. Lett.**, v. 55, p. 335-342, 1991.
- KARWATOWSKA-PROKOPCZUK, E., CIABATTONI, G., WENNMALM, A. Effect of adenosine on the formation of prostacyclin in the rabbit isolated heart. **Br. J. Pharmacol.**, v. 94, p. 721-728, 1988.
- KATO, H., ARAKI, T., CHEN, T., ITOYAMA, Y., KOGURE, K. Effect of rolipram on age-related changes in cyclic AMP-selective phosphodiesterase in

- the rat brain: an autoradiographic study. **Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.**, v. 20, p. 403-408, 1998.
- KATO, H., ARAKI, T., ITOYAMA, Y., KOGURE, K. Rolipram, a cyclic AMP-selective phosphodiesterase inhibitor, reduces neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 272, p.107-110, 1995.
- KATSUNUMA, H., IMAMURA, T., ISHIGAKI, Y. The clinical efficacy of trental against various types of cerebrovascular disease. **J. New Remedies and Clinics**, v. 31,p. 1845-1851, 1982.
- KEINANEN, K., WISDEN, W., SOMMER, B., WERNER, P., HERB, A., VERDOORN, T.A., SAKMANN, B., SEEBURG, P.H. A family of AMPA-selective glutamate receptors. **Science**, v. 249, p. 556-560, 1990.
- KELLER, A., PAVLIDES, C., ASANUMA, H. Long-term potentiation in the cat somatosensory cortex. **Neuroreport**, v. 1, p. 49-52, 1990.
- KELLER, J. N., HANNI, K. B., MATTSON, M. P., MARKESBERY, W. R. Cyclic nucleotides attenuate lipid peroxidation-mediated neuron toxicity. **Neuroreport**, v. 9, p. 3731-3734, 1998.
- KEMP, J. A., FOSTER, A. C., WONG, E. H. F. Noncompetitive antagonists of excitatory amino acid receptors. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 294-298, 1987.
- KHOO, J. C., MAHONEY, E. M., WITZTUM, J. L. Secretion of lipoprotein lipase by macrophages in cultures. **J. Biol. Chem.**, v. 256, p. 7105-7108, 1981.
- KIMELBERG, H. K., GODERIE, S. K., HIGMAN, S. *et al.* Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. **J. Neurosci.**, v. 10, p. 1583-1591, 1990.
- KIMELBERG, H. K. & BOURKE, R. S. Anion transport in the nervous system In **Handbook of Neurochemistry**, ed. A. Lajitha., v. 1, New York, Plenum, 1982, p. 31-67.
- KITATANI, T., HAYASHI, S., SAKAGUCHI, T. Effect of pentoxifylline on 5-hydroxy-tryptamine in the mouse brain. **Folia Pharmacologica Japonica**, v. 86, p. 353-358, 1985.

- KLECKNER, N. W. & DINGLEDINE, R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. **Science**, v. 241, p. 835-837, 1988.
- KOBALADZE, S. G., GIBRADZE, T. A. Einwirkung von Trental (pentoxifylline) auf das experimentell ischämische myokard. **Proc. of the Van Swieten Congress**, Viena, p. 269-270, 1979.
- KOERNER, J. F. & COTMAN, C. W. Micromolar L-2-amino-4-phosphonobutyric acid selectively inhibits perforant path synapses from lateral entorhinal cortex. **Brain Res.**, v. 216, p. 192-198, 1981.
- KOGA, T., SAKAI, T., TANAKA, C., SAITO, N. Presynaptic and  $Ca^{2+}$ -independent PKC subspecies modulates NMDAR<sub>1</sub>. **Curr. Neuroreport.**, v. 7, p. 477-480, 1996.
- KOH, J. Y., CHOI, D. W. Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 2153-2163, 1988.
- KOH, J. Y., PALMER, E., COTMAN, C. W. Activation of the metabotropic glutamate receptor attenuates N-methyl-D-aspartate neurotoxicity in cortical cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 9431-9435, 1991.
- KOH, J. Y., PETERS, S., CHOI, D.W. Neurons containing NADPH-diaphorase are selectively resistant to quinolinate toxicity. **Science**, v. 234, p.73-76, 1986.
- KOH, J., YANG, L. L., COTMAN, C. W. Beta-amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. **Brain Res.**, v. 533, p. 315-320, 1990.
- KOLB, B., SUTHERLAND, R. J., WHISHAW, I. Q. Comparison of the contributions of the prefrontal cortex and dorsomedial thalamic nucleus to spatially guided behavior in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 6, p. 365-378, 1982.
- KOPF, S. R., MELANI, A., PEDATA, F., PEPEU, G. Effect of A(1) and A(2) receptor antagonists. **Psychopharmacology**, v. 146, p. 214-219, 1999.



- KOWALL, N. W., BEAL, M. F. Cortical somatostatin, neuropeptide Y, and NADPH diaphorase neurons: normal anatomy and alterations in Alzheimer's disease. **Ann. Neurol.**, v. 23, p.105-114, 1988.
- KREMSNER, P. G., GRUNDMANN, H., NEIFER, S., SLIWA, K., SAHMULLER, G., HEGENSCHIED, B., BIENZLE, U. Pentoxifylline prevents murine cerebral malaria. **J. Infect. Dis.**, v. 164, p. 605-608, 1991.
- KRISTIAN, T. & SIESJO, B. K. Calcium-related damage in ischemia. **Life Sci.**, v. 59, p. 357-367, 1996.
- KUMAR, K. N., TILAKARATNE, N., JOHNSON, P. S., ALLEN, A. E., MICHAELIS, E. K. Cloning of cDNA for the glutamate-binding subunit of an NMDA receptor complex. **Nature**, v. 354, p. 70-73, 1991.
- LANCASTER, B. Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?-A review. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v. 16, p. 539-541, 1992.
- LANCELOT, E., LECANU, L., REVAUD, M-L, BOULU, R. G., PLOTKINE, M., CALLEBERT, J. Glutamate induces hydroxyl radical formation in vivo activation of nitric oxide synthase in Sprague-Dawley rats. **Neurosci. Lett.**, v. 242, p. 131-134, 1998.
- LANDFIELD, P. W., BRAUN, L. D., PITLER, T. A., LINDSEY, J. D., LYNCH, G. Hippocampal aging in rats: A morphometric study of multiple variables in semithin sections. **Neurobiology of Aging**, v. 2, p. 265-275, 1981.
- LANDIS, D. M. The early reactions of non-neuronal cells to brain injury. **Annu. Rev. Neurosci.**, v.17, p.133-151, 1994.
- LANTHORN, T. H., GANONG, A. H., COTMAN, C. W. 2-amino-4-phosphonobutyrate selectively blocs mossy fiber-CA3 responses in guinea pig but not rat hippocampus. **Brain Res.**, v. 290, p. 174-178, 1984.
- LASSERMAM, SCHMIED, M., VASS, K., HICKEY, W. F. Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. **Glia**, v. 7, p. 19-24, 1993.

- LAUTERBACH, R., GRABOWSKA, A., MARCINKIEWICZ, J. Effect of pentoxifylline on nitric oxide released by murine macrophages. **Biol. Neonate**, v. 67, p. 72-76, 1995.
- LEHMANN, J., HUTCHSON, A.J., McPHERSON, S., MONDADORI, C., SCHMUTZ, M. et al. CGS 19755, a selective and competitive N-methyl-D-aspartate-type excitatory amino acid receptor antagonist. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 246, p. 65-72, 1988.
- LEHMANN, J., SCHNEIDER, J., McPHERSON, S., MURPHY, D. E., BERNARD, P., TSAI, C., BENNETT, D. A., PASTOR, G., STEEL, D. J., BOEHM, C., CHENEY, D. L., LIEBMAN, J. M., WILLIAMS, M., WOOD, P. L. CPP, a selective N-methyl-D-aspartate (NMDA)-type receptor antagonist: characterization in vitro and in vivo. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 240, p. 737-746, 1987.
- LEMBOMTE, M-C & BOIVIN, P. Effects of methylxanthine derivatives on red cell phosphorylation. **Scand. J. Clin. Labor. Invest.**, v. 41(156), p. 291-295, 1981.
- LERMA, J., KUSHNER, L., ZUKIN, R. S., BENNETT, M. V. L. N-methyl-D-aspartate activates different channels than do kainate and quisqualate. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 86, p. 2083-2087, 1989.
- LEVIN, E. D. Nicotinic systems and cognitive function. **Psychopharmacology**, v. 108, p. 417-431, 1992.
- LEVIN, E. D., LEE, C., ROSE, J. E., REYES, A., ELLISON, G., JARVIK, M., GRITZ, E. Chronic nicotine and withdrawal effects on radial-arm maze performance in rats. **Behav. Neural Biol.**, v. 53, p. 269-276, 1990.
- LIANG, L., BESHAY, E., PRUD'HOMME, G. J. The phosphodiesterase inhibitors pentoxifylline and rolipram prevent diabetes in NOD mice. **Diabetes**, v. 47, p. 570-575, 1998.
- LIEW, F. Y. & COX, F. E. Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. **Immunol. Today**, v. 12, p. A17-A21, 1991.

- LINDGARDE, F., JELNES, R., BJORKMAN, H. *et al.* Conservative drug treatment in patients with moderately severe chronic occlusive peripheral arterial disease. **Circulation**, v. 80, p. 1549-1556, 1989.
- LINDSAY, R. M. Reactive gliosis. **Fedoroff & Vernadakis**, p. 231-262, 1986.
- LING, E-A. & WONG, W-C. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: A historical review and current concepts. **Glia**, v. 7, p. 9-18, 1993.
- LIPSCOMBE, D., MADISON, D. V., POENIE, M., REUTER, H., TSIEN, R. Y., TSIEN, R. W. Spatial distribution of calcium channels and cytolitic calcium transients in growth cones and cell bodies of dympathetic neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 2398-2402, 1988.
- LIPTON, S. A. Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide. **Trends Neurosci.**, v. 16, p. 527-532, 1993.
- LIPTON, S. A., CHOI, Y, -B., PAN, Z., -H., LEI, S., Z., CHEN, H., -S. V., SUCHER, N. J., LOSCALZO, J., SINGEL, D. J., STAMLER, J. S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, v. 364, p. 626-632, 1993.
- LIPTON, S.A., SUCHER, N.J., KAISER, P.K., DREYER, E.B. Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. **Neuron**, v. 7, p. 111-118, 1991.
- LONDOS, C. & WOLFF, J. Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 74, p. 5482-5486, 1977.
- LOPEZ, F., MILLER, L. G., GREENBLATT, D. J., KAPLAN, G. B., SHADER, R. I. Interaction of caffeine with the GABA<sub>A</sub> receptor complex: alterations in receptor function but not ligand binding. **Eur. J. Pharmacol.** V. 172, p. 453-459, 1989.
- LOWENSTEIN, P. R., VACAS, M. I., CARDINALI, D. P. Effect of pentoxifylline on  $\alpha$ -and  $\beta$ -adrenoceptor sites on cerebral cortex medial basal hypothalamus and pineal gland of the rat. **Neuropharmacol.**, v. 21, v. 243-248, 1982.

- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-75, 1951.
- LUCAS, M. A. Prevention of post-operative thrombosis in peripheral arteriopathies. Pentoxifylline vs conventional antiaggregants: a six-month randomized follow-up study. **Angiology**, v. 35, p. 443-450, 1984.
- LUKE, D. R., BERENS, K. L., VERANI, R. R. Role of vascular decongestants in ischemic acute renal failure defined by postinsult administration of pentoxifylline. **Renal Failure**, v. 11, p. 187-194, 1989.
- LÜTTGAU, H. C. & OETLIKER, H. The action of caffeine on the activation of the contractile mechanism in striated muscle fibres. **J. Physiol.**, v. 194, p. 51-54, 1968.
- LYNCH, G., LARSON, J., KELSO, S., BARRIONUEVO, G., SCHOTTLER, F. Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. **Nature**, v. 305, p. 719-721, 1983.
- MA, L., ZABLOW, L., KANDEL, E. R., SIEGELBAUM, S. A. Cyclic AMP induces functional presynaptic boutons in hippocampal CA3-CA1 neuronal cultures. **Nat. Neurosci.**, v. 2, p. 24-30, 1999.
- MALENKA, R. C. & NICOLL, R. A. Long-term potentiation—a decade of progress? **Science**, v. 285, p. 1870-1874, 1999.
- MANDELL, G. L. Cytokines, phagocytes, and pentoxifylline. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 25 (Suppl. 2), p. S20-S22, 1995.
- MANEV, H., FAVARON, M., GUIDOTTI, A., COSTA, E. Delayed increase of  $Ca^{2+}$  influx elicited by glutamate: role in neuronal death. **Mol. Pharmacol.**, v. 36, p. 106-112, 1989.
- MANEV, H., FAVARON, M., SIMAN, R., GUIDOTTI, A., COSTA, E. Glutamate neurotoxicity is independent of calpain I inhibition in primary cultures of cerebellar granule cells. **J. Neurochem.**, v. 57, p. 1288- 1295, 1991.

- MANRIQUE R. Blood coagulation, rheology and coronary reocclusion after local thrombolysis in myocardial infarction. **World Congress, International Union of Angiology**, Abstract Volume XII Rochester, Minnesota, USA, p. 11-16, 1983.
- MANZONI, O., FAGNI, L., PIN, J. P., RASSENDREN, F., POULAT, F., SLADDECZEK, F., BOCKAERT, J. (trans)-1-amino-cyclopentyl-1,3-dicarboxylate stimulates quisqualate phosphoinositide-coupled receptors but not ionotropic glutamate receptors in striatal neurons and *Xenopus* oocytes. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, p. 1-6, 1990.
- MARANGOS, P. J., PAUL, S. M., GOODWIN, F. K. Putative endogenous ligands for the benzodiazepine receptor. **Life Sci.**, v. 25, p. 1093-1102, 1979.
- MARANGOS, P. J., PAUL, S. M., PAMA, A. M., GOODWIN, F. K., SYAPIN, P., SKOLNICK, P. Purinergic inhibition of diazepam binding to rat brain *in vitro*. **Life Sci.**, v. 24, p. 851-858, 1979b.
- MAREN, S. & BAUDRY, M. Properties and mechanisms of long-term synaptic plasticity in the mammalian brain: Relationships to learning and memory. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 63, p. 1-18, 1995.
- MARK, R. J., ASHFORD, J. W., MATTSON, M. P. Anticonvulsants attenuate amyloid  $\beta$ -peptide neurotoxicity and promote maintenance of calcium homeostasis. **Neurobiol. Aging**, v. 16, p. 187- 198, 1994.
- MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **J. Biochem.**, v. 268, p. 12231-12234, 1993.
- MARRAMA, P., BARAGHINI, G. F., CARANI, C., CELANI, M. F., GIOVENCO, P. *et al.* Further studies on the effects of pentoxifiline on sperm count and sperm motility in patients with idiopathic oligoasthenozoospermia. **Andrologia**, v. 17 p.612-616, 1985.
- MARTINEZ-HERNANDEZ A, BELL K. P., NORENBER, G. M.D. Glutamine synthetase: glial localization in brain. **Science**, v. 195, p. 1356-1358, 1977.

- MARTINEZ-SERRANO, A. & SATRUSTEGUI, J. Caffeine-sensitive calcium stores in presynaptic nerve endings: a physiological role. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 161, p. 965-971, 1989.
- MASON, S. T. Central noradrenergic-cholinergic interaction and locomotor behavior. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 56, p. 131-137, 1979.
- MASSICOTTE, G., OLIVER, M. W., LYNCH, G., BAUDRY, M. Effect of bromophenacyl bromide, a phospholipase A2 inhibitor, on the induction and maintenance of LTP in hippocampal slices. **Brain Res.**, v. 537, p. 49-53, 1990.
- MASSIEU, L., MORALES-VILLAGRÁN, A., TAPIA, R. Accumulation of extracellular glutamate by inhibition of its uptake is not sufficient for inducing neuronal damage: an in vivo microdialysis study. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2262-2271, 1995.
- MATTSON, M. P. & KATER, S. B. Excitatory and inhibitory neurotransmitters in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. **Brain Res.**, v. 478, p. 337-348, 1989.
- MATTSON, M. P. & KATER, S. B. Intracellular messengers in the generation and 'degeneration' on of hippocampal neuroarchitecture. **J. Neurosci. Res.**, v. 21, p. 447- 464, 1988.
- MATTSON, M. P. & SCHEFF, S. W. Endogenous neuroprotection factors and traumatic brain injury: mechanisms of action and implications for therapy. **J. Neurotrauma**, v. 11, p. 3-33, 1994.
- MATTSON, M. P. Acetylcholine potentiates glutamate-induced neurodegeneration in cultured hippocampal neurons. **Brain Res.**, v. 497, p. 402-406, 1989.
- MATTSON, M. P. Secreted forms of  $\beta$ -amyloid precursor protein modulate dendrite outgrowth and calcium responses to glutamate in cultured embryonic hippocampal neurons. **J. Neurobiol.**, v. 25, p. 439-450, 1994.
- MATTSON, M. P., CHENG, B., CULWELL, A., ESCH, F., LIEBERBURG, I., RYDEL, R. E. Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-

- regulating roles for secreted forms of  $\beta$ -amyloid precursor protein. **Neuron**, v. 10, p: 243-254, 1993.
- MATTSON, M. P., DOU, P., KATER, S. B. Outgrowth- regulanting actions of glutamate in isolated hippocampal pyramidal neurons. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 2087-2100, 1988.
- MATTSON, M. P., KUMAR, K., CHENG, B., WANG, H., MICHAELIS, E. K. Basic FGF regulates the expression of a functional 71 kDa NMDA receptor protein that mediates calcium influx and neurotoxicity in cultured hippocampal neurons. **J Neurosci.**, v. 13, p. 4575-4588, 1993.
- MATTSON, M. P., LOVELL, M. A., FURUKAWA, K., MARKESBERY, W. R. Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. **J. Neurochem.**, v. 65, 1740-1751, 1995.
- MAYER, M. L. & VYKLICKY, L. Concanavalin A selectively reduces desensitization of mammalian neuronal quisqualate receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 86, p. 1411-1415, 1989.
- McCARLIN, P. P., YU, X. Z., HO, I. K., SMITH, T. G. Amitriptyline prevents N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced toxicity, does not prevent NMDA-induced elevations of extracellular glutamate, but augments kainate-induced elevations of glutamate. **J. Neurochem.**, v. 59, p. 401-405, 1992.
- McCGAUGH, J. L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. **Annu. Ver. Neurosci.**, v. 12, p. 255-287, 1989.
- McCORD, J. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.**, v. 312, p. 159-163, 1985.
- McCULLOCH, J., IVERSEN, L. L. Autoradiographic assessment of the effects of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists in vivo. **Neurochem. Res.**, v. 16, p. 951-963, 1991.

- McCULLOCH, R. M., JOHNSTON, G. A. R., GAME, C. J. A., CURTIS, D. R. The differential sensitivity of spinal interneurons and Renshaw cells to Kainate and N-methyl-D-aspartate. **Exp. Brain Res.**, v. 21, p. 515-518, 1974.
- McDONALD, J. W., SILVERSTEIN, F. S., JOHNSTON, M. V. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous system. **Brain Res.**, v. 459, p. 200-203, 1988.
- McDONALD, R. J. & WHITE, N. J. Parallel information processing in the water maze: Evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. **Behav. Neural Biol.**, v. 61, p. 260-270, 1994.
- McEWEN, B. S. & SAPOLSKY, R. M. Stress and cognitive function. **Curr. Opinion in Neurobiol.**, v. 5, p. 205-216, 1995.
- McGAUGH, J. L. Involvement of hormonal and neuromodulatory systems in the regulation of memory storage. **Ann. Ver. Neurosci.**, v. 12, p. 255-287, 1989.
- McGAUGH, J. L., CAHILL, L., PARENT, M. B., MESCHES, M. H., COLEMAN-MESCHES, K., SALINAS, J. A. Involvement of the amygdala in the regulation of memory storage. In J. L. McGaugh, F. Bermudez-Rattoni & R. A. Prado-Alcalá (Eds.), **Plasticity in the central nervous system: Learning and memory**, Mahwah, N. J.: Erlbaum, 1995, p. 17-39.
- McGEER, P.L. & ROGERS, J. Anti-inflammatory agents as a therapeutic approach to Alzheimer's Disease. **Neurology**, v. 42, p. 447-449, 1992.
- McLENNAN, H. Receptors for the excitatory amino acids in the mammalian central nervous system. **Prog. Neurobiol.**, v. 20, p. 251-271, 1983.
- MEISTRELL, M. E. 3rd, BOTCHKINA, G. I., WANG, H., DI SANTO, E., COCKROFT, K. M., BLOOM, O., VISHNUBHAKAT, J. M., GHEZZI, P., TRACEY, K. J. Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. **Shock**, v. 8, p. 341-348, 1997.
- MELDRUM, B. & GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 379, 1990.



- MELDRUM, B. Pathophysiology of cerebral ischemia and trauma in relation to possible therapeutic approaches. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 361, p.275-290, 1990.
- 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.**, v. 251, p. 238-246, 1989.
- MERRILL, J. E. & ZIMMERMAN, R. P. Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF $\beta$ . **Glia**, v. 4, p. 327-331, 1991.
- MESULAM, M. M., MUFSON, E. J., WAINER, B. H., LEVERY, A. I. Central cholinergic pathways in the rat: a review based on an alternative nomenclature (Ch1-Ch6). **Neuroscience**, v. 10, p. 1185-1201, 1983.
- MEUCCI, O., FATATIS, A., HOLZWARTH, J. A., MILLER, R. Developmental regulation of the toxin sensitivity of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptors in cortical glia. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 519-530, 1996.
- MEYER, R. C., SPANGLER, E. L., KAMETANI, H., INGRAM, D. K. Age-associated memory impairment. Assessing the role of nitric oxide. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 854, p. 307-317, 1998.
- MICIC, D. V., STEFANOVICH, V., MRSULJA, B. B. The effect of pentoxifylline on cytotoxic form of ischemic brain edema in mongolian gerbil. **IRCS Med. Sci.**, v.9: p. 709, 1981.
- MILLER, R. H. & SZIGETI, V. Clonal analysis of astrocyte diversity in neonatal rat spinal cord cultures. **Development**, v. 113, p. 353-362, 1991.
- MILNER, B. Clues to the cerebral organization of memory. In P. A. Buser and A. Rougel-Buser (Eds.), **Symposium on Cerebral Correlates of Conscious Experience**, Amsterdam, Elsevier, 1978, p. 139-153.
- MIYAKE, T., OKADA, M., KITAMURA, T. Reactive proliferation of astrocytes studied by immunohistochemistry for proliferating cell nuclear antigen. **Brain Res.**, v. 590, p. 300-302, 1992.

- MIYAZAKI, S., IMAIZUMI, M., ABIRU, T., MACHIDA, H. Effects of nucleotides on learning and memory in a Morris water maze test in normal and basal forebrain-lesioned rats. **Life Sci.**, v. 64, p. 45-52, 1999.
- MOGI, M., TOGARI, A., TANAKA, K., OGAWA, N., ICHINOSE, H., NAGATSU, T. Increase in level of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats without influence of systemic L-DOPA on the TNF-alpha induction. **Neurosci. Lett.**, v. 268, p. 101-104, 1999.
- MOLINEGRO, L., SCORDO, I., PASTORELLO, B. Action of caffeine, L-PIA and their combination on memory retention in the rat. **Life Sci.**, v. 54, p. 1247-1250, 1994.
- MONAGHAN, D. T., OLVERMAN, H. J., NGUYEN, L., WATKINS, J. C., COTMAN, C. W. Two classes of NMDA recognition sites: Differential distribution and differential regulation by glycine. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, p. 9836-9840, 1988.
- MONCADA, C., LEKIEFFRE, D., ARVIN, B., MELDRUM, B. Effect of NO synthase inhibition on NMDA- and ischaemia-induced hippocampal lesions. **Neuroreport**, v. 3, p. 530-532, 1992.
- MONCADA, S., HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **Eur. J. Clin. Invest.** v. 21, p. 361-74, 1991.
- MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p.1709-1715, 1989.
- MONTGOMERY, R. R. & COHN, Z. A. Endocytic and secretory repertoire of the lipid-loaded macrophage. **J. Leukocyte Biol.**, v. 45, p. 129-138, 1989.
- MONYER, H., SPRENGEL, R., SCHOEPFER, R., HERB, A., HIGUCHI, M., LOMELI, H., BURNASHEV, N. SAKMANN, B., SEEBURG, P. H. Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. **Science**, v. 256, p. 1217-1221, 1992.

- MORRIS, R. G. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **J. Neurosci. Meth.**, v. 11, p. 47-60, 1984.
- MORRIS, R. G. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learn. Motiv.**, v. 12, p. 239-260, 1981.
- MORRIS, R.G., ANDERSON, E, LYNCH, G. S. BAUDRY, M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. **Nature**, v. 319, p. 774-776, 1986.
- MOTAIS, R. Lack of effect of pentoxifylline on chloride and glucose permeability in human red cells. **Scand. J. Clin. Labor. Invest.**, v.41(156), p.281, 1981.
- MUGGEO, M., CALABRO, A., BUSINARO, V. *et al.* Blood clotting, fibrinolytic and haemorrhological parameters in ischaemic vascular disease. **Pharmatherapeutica**, v. 3, p. 74-90, 1983.
- MÜLLER R. Hemorheology and peripheral vascular diseases: a new therapeutic approach. **J. of Medicine**, v.12, p.209-235, 1981.
- MÜLLER R. Pentoxifylline- a biomedical profile. **J. of Medicine**, v.10, p. 307-329, 1979.
- MÜLLER R., LEHRACH, F. Haemorheology and cerebrovascular disease: multi-functional approach with pentoxifylline. **Current Medical Research and Opinion**, v. 7, p.253-263, 1981.
- MURRAY, J. K. & ENGLAND, J.P. Inhibitors of cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic agents. **Bioch. Soc. Trans.**, v. 20, p. 460-464, 1992.
- MURRAY, M., WANG, S. D., GOLDBERGER, M. E., LEVITT, P. Modification of astrocytes in the spinal cord following dorsal root or peripheral nerve lesions. **Exp. Neurol.**, v. 110, p. 248-257, 1990.
- NAKAMURA, M., NISHIO, C., NONOMURA, T., HATANAKA, H. High potassium and cyclic AMP analog promote neuronal survival of basal forebrain cholinergic neurons in culture from postnatal 2-week-old rats. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 81, p. 218-229, 1994.

- NATHAN, C. F. & ROOT, R. K. Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages. **J. Exp. Med.**, v. 146, p. 1648-1662, 1977.
- NATHAN, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. **FASEB J.**, v. 6, p. 3051-3064, 1992.
- NATHAN, C., MURRAY, H., COHN, Z. The macrophage as an effector cell. **N. Engl. J. Med.**, v. 303, p. 622-625, 1980.
- NAWASHIRO, H., MARTIN, D., HALLENBECK, J. M. Inhibition of tumor necrosis factor and amelioration of brain infarction in mice. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 17, p. 229-232, 1997.
- NEERING, I. R. & MCBURNEY, R. N. Role for microsomal Ca storage in mammalian neurones? **Nature**, v. 309, p. 158-160, 1984.
- NG, K.T., GIBBS, M.E., CROWE, S.F., SEDMAN, G.L., HUA, G.L., ZHAO, W. ODOWD, B., RICKARD, N., GIBBS, C.L., SYKOVA, E., SVOBODA, J., JENDELOVA, P. Molecular mechanisms of memory formation., **Mol. Neurobiol.**, v. 5, p. 333-350, 1991.
- NICHOLLS, D. & ATTWELL, D. The release and uptake of excitatory amino acids. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 462-468, 1990.
- NICHOLSON, C. D., CHALLIS, R. A., SHAHID, M. Differential modulation of tissue function and therapeutic potential of selective inhibitors of cyclic phosphodiesterase isoenzymes. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p. 19-27, 1991
- NICOLETTI, F., WROBLEWSKI, J. T., NOVELLI, A., ALHO, H., GUIDOTTI, A., COSTA, E. The activation of inositol phospholipid metabolism as a signal-transducing system for excitatory amino acids in primary cultures cerebellar granule cells. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 1905-1911, 1986.
- NICOLL, R. A. & MALENKA, R. C. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 377, p. 115-117, 1995.
- NICOTERA, P., BELLOMO, G., ORRENIUS, S. Calcium-mediated mechanisms in chemically induced cell death. **Ann. Ver. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 449-470, 1992.

- NIEUWENHUYS, R. In: **Chemoarchitecture of the brain**. Berlin: Spriger-Verlag, 1985.
- NIEUWENHUYS, R., VOOGD, J., VAN HUIJZEN, C. In: **The Human Central Nervous System, a synopsis and atlas**, 3<sup>a</sup> edition,. Berlin: Spriger-Verlag, 1988, pp. 336-340.
- NIKODIJEVIC, D., JACOBSON, K. A., DALY, J. W. Locomotor activity in mice during chronic treatment with caffeine and withdrawal. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 44, p. 199-216, 1993.
- NIKODIJEVIC, O., SARGES, R., DALY, J. W., JACOBSON, K. A. Behavioral effects of A<sub>1</sub>- and A<sub>2</sub>-selective adenosine agonists and antagonists: evidence for synergism and antagonism. **J. Exp. Pharmacol. Ther.**, v. 1, p. 286, 1991.
- NOLTE D. Lungefunktionsuntersuchungen zur bronchospasmolytischen Wirkung von 3,7- Dimethyl-1-(5-Oxo-hexyl)- Xanthine. **Arzneimittel-Forschung**, v.21, p.1453,1971.
- NORMILE, H. J. & BARRACO, R. A. N<sup>6</sup>-Cyclopentyladenosine impairs passive avoidance retention by selective action at A<sub>1</sub> receptors. **Brain Res. Bull.**, v. 27, p. 101, 1991.
- OHISHI, H., SHIGEMOTO, R., NAKANISHI, S., MIZUNO, N. Distribution of the messenger RNA for a metabotropic glutamate receptor, mGluR2, in the central nervous system of the rat. **Neuroscience**, v. 53, p. 1009-1118, 1993.
- OLNEY, J. W. Glutamate-induced neuronal necrosis in the infant mouse hypothalamus: an electron microscopic study. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.**, v. 30, p. 75-90, 1971.
- OLNEY, J. W., HO, O. L., RHEE, V. Cytotoxic effects of acidic and sulphur containing amino acids on the infant mouse central nervous system. **Exp. Brain Res.**, v. 14, p. 61-76, 1971.
- OLNEY, J. W., LABRUYERE, J., WANG, G., WOZNIAK, D. F., PRICE, M. T., SESMA, M. A. NMDA antagonist neurotoxicity: mechanism and prevention. **Science**, v. 254, p. 1515-1518, 1991.

- OLTON, D. S. & SAMUELSON, R. J. Remember of places passed: spatial memory in rats. **J. Exp. Psychol.: Animal Behav. Processes**, v. 2, p. 97-115, 1976.
- OLSSON, T., MACHLEN, J., LÖVE, A. *et al.* Induction of class I and class II transplantation antigens in rat brain during fatal and non-fatal measles virus infection. **J. Neuroimmunol.**, v. 12, p. 265-277, 1987.
- OLTON, D. S. Memory functions and the hippocampus. In W. Seifert (Ed.), **Neurobiology of the Hippocampus**, Academic Press, 1983, p. 335-373.
- ONGINI, E., ADAMI, M., BERTORELLI, R. Adenosine A2A receptors and neuroprotection. **Am. N. Y. Acad. Sci.**, v. 825, p. 30-48, 1997.
- OYAMA, Y., HAYASHI, A., UEHA, T., CHIKAHISA, L., FURUKAWA, K. Fluorescent estimation of the effect of Ca<sup>2+</sup> antagonists on the oxidative metabolism in dissociated mammalian brain neurons. **Brain Res.**, v. 610, p. 172-175, 1993.
- PALMER, A. M., PROCTOR, A. W., STRATMAN, G. C., BOWEN, D. M. Excitatory amino acid-releasing and cholinergic neurons in Alzheimer's disease. **Neurosci Lett.**, v. 60, p. 199-204, 1986.
- PASSERO S, NARDINI M, BATTISTINI M. Effect of pentoxilylline on cerebral blood flow in patients with chronic cerebrovascular disease. **J. International Med. Res.**, v.9, p. 211-214,1981.
- PAXINOS G. & WATSON C. **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**. 2nd edn. Academic Press, Sydney, 1982.
- PEREDERY, O., PERSINGER, M. A., BLOMME, C., PARKER, G. Absence of material behaviour in rats with lithium/pilocarpine seizure induced brain damage: support of Macleans triune brain theory. **Physiol. Behav.**, v. 52, p. 665-671, 1992.
- PEREGO, M. A., SERGIO, G., ARTALE, F. *et al.* Haemorrhological improvement by pentoxifylline in patients with peripheral arterial occlusive disease. **Curr. Med. Res. Opin.**, v. 10, p. 135-138, 1986.

- PESSAH, I. N., STAMBUK, R. A., CASIDA, J. E.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated ryanodine binding mechanisms of sensitivity and intensity modulation by  $\text{Mg}^{2+}$ , caffeine, and adenine nucleotides. **Mol. Pharmacol.**, v. 31, p. 232-238, 1987.
- PHILLIS, J. W. & WU, P. H. The role of adenosine and its nucleotides in central synaptic transmission. **Prog. Neurobiol.**, v. 16, p. 187-239, 1981.
- PILLA G, CIAPONI A, MIGLIAVACCA A, BONORA C. L'insufficienza cerebrovascolare cronica senile. Effetti del suloctidil e della pentossifilina sulla deformabilita eritrocitaria. **La Ricerca Clinica e in Laboratorio**, v. 13 (3), p.459-464, 1983.
- PLUM, C. M., Free amino acid levels in the cerebrospinal fluid of normal humans and their variation in cases of epilepsy and Spielmeier-Vogt-Batten disease, **J.Neurochem.**, v.23,p.595-600,1974.
- POBER, J. S. & COTRAN, R. S. Cytokines and endothelial cell biology. **Physiol. Rev.**, v. 70, p. 427-451, 1990.
- POGGESI, L., SCARTI L., BODDI, M., MASOTTI, G., SERNERI, G. G. N., Pentoxifylline treatment in patient with occlusive peripheral arterial disease. Circulatory changes and effects on prostaglandin synthesis. **Angiology**, v. 36, p. 628-636, 1985.
- POHLE, W., RÜTHRICH, H. L., POPOV, N., MATTHIES, H. Fucose incorporation into rat hippocampus structures after acquisition of a brightness discrimination. **Acta Biologica et medica Germanica**, v. 38, p. 53-63, 1979.
- POLC, P., BONETTI, E. P., PIERI, L., CURNIN, R., ANGIOI, R. M., MÖHLER, H., HAEFLEY, W. E. Caffeine antagonizes several central effects of diazepam. **Life Sci.**, v. 28, p. 2265-2275, 1981.
- PONTECORVO, M. J., CLISSOLD, D. B., WHITE, M. F., FERKANY, J. W. N-methyl-D-aspartate antagonists and working memory performance: comparison with the effects of scopolamine, propranolol, diazepam, and phenylisopropyladenosine. **Behav. Neurosci.**, v. 105, p. 521-535, 1991.

- POPOLI, P., GIMENEZ-LLORT, L., PEZZOLA, A., REGGIO, R., MARTINEZ, E., FUXE, K., FERRE, S. Adenosine A1 receptor blockade selectively potentiates the motor effects induced by dopamine D1 receptor stimulation in rodents. **Neurosci. Lett.**, v. 8, p. 209-213, 1996.
- POPOLI, P., REGGIO, R., PEZZOLA, A., FUXE, K., FERRE, S. Adenosine A1 and A2A receptor antagonists stimulate motor activity: evidence for an increased effectiveness in aged rats. **Neurosci. Lett.**, v. 31, p. 201-204, 1998.
- PORSCHKE, E. & STEFANOVICH, V. The influence of pentoxifylline on ATPase activity of human erythrocyte membranes. **IRCS Medical Sci.**, v. 6, p. 285, 1978.
- PORSCHKE, E. & STEFANOVICH, V. The influence of pentoxifylline and theophylline on reaction kinetics on rat brain ATPase stimutable by catecholamines. **Arzneimittel-Forschung**, v. 29, p. 1089-1092, 1979.
- PORTER, J. M., CUTLER, B. S., LEE, B. Y., SCOGIN, J. T., STRANDNESS, D. E. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. **Am. Heart J.**, v 104, p. 66-72, 1982.
- PULSINELLI, W. A. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. **Prog Brain Res.**, v.63, p.29-37, 1985.
- PULSINELLI, W. A. & DUFFY, T. E. Regional energy balance in rat brain after transient forebrain ischemia. **J. Neurochem.**, v. 40, p. 1500-1503, 1983.
- RAITHEL, D. & KASPRZAK, P. Prevention of reocclusion after synthetic prosthetic bypass-operations in femoropopliteal area: comparative randomized study of pentoxifylline versus acetylsalicylic acid. **Angiology**, v. 36, p. 678, 1985.
- RALL, T. W. Central nervous system stimulant: the methylxanthines. In A. G. Gilman, T. W. Rall and F. Murad (Eds.), **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Academic Press, 1983, p. 335-373.



- RALL, T. W. Drugs used in the treatment of asthma. The methylxanthines, cromolyn sodium, and other agents. In **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, ed. A. G. Gilman, T. W. Rall, A. S. Niew, P. Taylor, Pergamon Press, Elmsford, NY, 1990, p. 618-637.
- RALL, T. W. Evolution of the mechanism of action of methylxanthines: from calcium mobilizers to antagonists of adenosine receptors. **Pharmacologist**, v. 24, p. 277-287, 1982.
- RAMAGOPAL, M. V., LEIGHTON, H. J. Effects of NG-monomethyl-L-arginine on field stimulation-induced decreases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels and relaxation in the rat anococcygeus muscle. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 174, p. 297-299, 1989.
- RANDT, C. T., JUDGE, M. E., BONNET, K. A., QUARTERMAIN, D. Brain cyclic AMP and memory in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 17, p. 677-680, 1982.
- RANSOM, R. W. & STEC, N. L. Cooperative modulation of [3H]MK-801 binding to the N-methyl-D-aspartate receptor-ion channel complex by L-glutamate, glycine, and polyamines. **J. Neurochem.**, v. 51, p. 830-836, 1988.
- RAO, K. M., SIMEL, D. L., COHEN, H. J., CRAWFORD, J., CURRIE, M. S. Effects of pentoxifylline administration on blood viscosity and leukocyte cytoskeletal function in patients with intermittent claudication. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 115, p. 738-744, 1990.
- REICH, T. & GILLINGS, D. Effects of pentoxifylline on severe intermittent claudication. **Angiology**, v. 38, p. 651-656, 1987.
- REYMANN, K. Mechanisms underlying synaptic long-term potentiation in the hippocampus: Focus on postsynaptic glutamate receptors and protein kinases. **Functional Neurology**, v. 8, p. 7-32, 1993.
- REYNOLDS, I. J. Arcaine is a competitive antagonist of the polyamine site on the NMDA receptor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 177, p. 215-216, 1990.

- RIBEIRO, J. A. & SEBASTIÃO, A. M. Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A<sub>3</sub>) adenosine receptor. **Prog. Neurobiol.**, v. 26, p. 179-209, 1986.
- RIBEIRO, J. A. Purinergic regulation of transmitter release. In **Adenosine and Adenine Nucleotides as Regulators of cellular Function**, CRC Press, Boca Raton, FL, p. 155-167, 1991
- RICHIE, J. M. Central nervous system stimulants. The Xanthines. In **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, ed. L. S. Goodman and A. Gilman, MacMillan, NY, p. 367-378, 1975.
- RIEDEL, G. Function of metabotropic glutamate receptors in learning and memory. **Trends in Neurosci.**, v. 19, p. 219-224, 1996.
- RIEDEL, G., WETZEL, W., REYMANN, K. G. (R,S)-alpha-methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG) blocks spatial learning in rats and long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **Neurosci. Lett.**, v. 167, p. 141-144, 1994.
- RIEDEL, W., HOGERVORST, E., LÉBOUX, R., VERHEY, F., VAN PRAAG, H., JOLLES, J. Caffeine attenuates scopolamine-induced memory impairment in humans. **Psychopharmacology**, v. 122, p. 158-168, 1995.
- RIENECK, K., DIAMANT, M., HAAHR, P., SCHONHARTING, M., BENTZEN, K. *In vitro* immunomodulatory effects of pentoxifylline. **Immunology Letters**, v. 37, p. 131-138, 1993.
- RIO-HORTEGA, P. Microglia. In: **Cytology and cellular pathology of the nervous system**, Penfield W. (ed.), N.Y. Hoeber, 1932, p. 481-584.
- ROACHE, J. D. & GRIFFITHS, R. R. Interactions of diazepam and caffeine: behavioral and subjective dose effects in humans. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 26, p. 801-812, 1987.
- ROB, P. M., FANDREY, J., JELKMANN, W. Theophylline a new concept of nephroprotection in acute cyclosporine nephrotoxicity? **Klin. Wochenschr.**, v. 67, p. 648-654, 1989.

- ROBINSON, M. B., SINOR, J. D., DOWD, L. A., KERWIN, J. F. Subtypes of sodium-dependent high-affinity L-[<sup>3</sup>H]glutamate transport activity: pharmacologic specificity and regulation by sodium and potassium. **J Neurochem.**, v. 60, p. 167-179, 1993.
- ROOZENDALL, B. & McGAUGH, J. L. Amygdaloid nuclei lesions differentially affect glucocorticoid-induced memory enhancement in an inhibitory avoidance task. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 65, p. 1-8, 1996.
- ROSENBERG, P. A., AMIN, S., LEITNER, M. Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. **J Neurosci** 12: 56-61, 1992.
- ROTHMAN, S. M. & OLNEY, J. W. Excitotoxicity and the NMDA receptor. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 299-302, 1987.
- ROTHMAN, S. M. & OLNEY, J. W. Glutamate and the pathophysiology of hypoxic/ischemic brain damage. **Ann. Neurol.**, v. 19, p. 105-111, 1986.
- ROTHSTEIN, J. D., MARTIN, L. J., KUNCL, R. W. Decreased glutamate transport by the rat brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. **N. Eng. J. Med.**, v. 326, p. 1464-1468, 1992.
- ROUSSINOV, K. & YONKOV, D. Effects of imidazole, papaverine, and histamine on learning and memory in albino rats. **Acta Physiol. Bulg.**, v. 2, p. 49-57, 1976.
- ROUTTENBERG, A. & KIM, H. J. Monoaminergic-cholinergic interactions during memory formation in the nigro-striatal system: Libet's model. In **Cholinergic-Monoaminergic Interactions in the Brain**, ed. By L. Butcher, New York Academic Press, 1978, p. 320-321.
- SACAAN, A. I. & SCHOEPP, D. D. Activation of hippocampal metabotropic excitatory amino acid receptors leads to seizures and neuronal damage. **Neurosci. Lett.**, v. 139, p. 77-82, 1992.
- SAKAGUCHI, T., HAYASHI, S. Pharmacology and clinical trials of pentoxifylline. **Pharmacometrics**, v.15, : p.153-183,1978.

- SALGANICOFF, L. & DE ROBERTIS, E. Subcellular distribution of the enzymes of the glutamatic acid, glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid cycles in rat brain. **J. Neurochem.**, v. 12, p. 287-309, 1965.
- SALDAN, I. R.. The usage of disaggregants for the treatment of diabetic retinopathy. **Oftalmologicheskii Zhurnal**, v.7, p.395-398, 1984.
- SALLINGOVA, Z. & KOHUT, A. Pentoxifylline-associated reduction of indomethacin-induced rat gastric mucosal injury is supported by decreased lipid peroxidation. **Physiol. Res.**, v. 43, p. 95-99, 1994.
- SAMLASKA, C. P. & WINFELD, E. A. Pentoxifylline. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 30, p. 603-621, 1994.
- SANDBERG, M., BUTCHER, S. P., HAGBERG, H. Extracellular overflow of neuroactive amino acids during severe insulin-induced hypoglycemia: in vivo dialysis of the rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 47, p. 178-184, 1986.
- SANFELIU, C., HUNT, A., PATELL, A. J. Exposure to *N*-methyl-D-aspartate increases release of arachidonic acid in primary cultures of rat hippocampal neurons and not in astrocytes. **Brain Res.**, v. 526, p. 241-248, 1990.
- SARA, S. J. Noradrenergic-cholinergic interaction: its possible role in memory dysfunction associated with senile dementia. **Arch. Gerontol. Geriatr. Suppl.**, v. 1, p. 99-108, 1989.
- SATOH, M., ISHIHARA, K., IWAMA, K., TAKAGI, H. Aniracetam augments, and midazolam inhibits, the long-term potentiation in guinea-pig hippocampal slices. **Neurosci. Lett.**, v. 68, p. 216-220, 1986.
- SCATTON, B. Excitatory amino acid receptor antagonists: a novel treatment for ischemic cerebrovascular diseases. **Life Sci.**, v. 55, p. 2115-2124, 1994.
- SCHAEFER K, VON HERRATH D, HENSEL A, GRIGOLEIT H-G. Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Pentoxifyllin bei chronischer Niereninsuffizienz. **Medizinische Klinik**, v.72, p.204-206, 1979.

- SCHENK, F. & MORRIS, R. G. Dissociation between components of spatial memory in rats after recovery from the effects of retrohippocampal lesions. **Exp. Brain Res.**, v. 58, p. 11-28, 1985.
- SCHINGNITZ, G., KÜFNER-MÜHL, U., ENSINGER, H., LEHR, E., KUHN, F. J. Selective A<sub>1</sub>-antagonists for treatment of cognitive deficits. **Nucleosides Nucleotides**, v. 5, p. 1067, 1991.
- SCHMID, A., KOCH, M., SCHNITZLER, H., -U. Conditioned pleasure attenuates the startle response in rats. **Neurobiol. Learn. Mem.**, v. 64, p. 1-3, 1995.
- SCHMID-SCHONBEIN H, VOLGER E. Red-cell agregation and red cell deformability in diabetes. **Diabetes** v. 25:( suppl. 1), p. 897-902, 1976.
- SCHOEPP, D. D. & CONN, P. J. Metabotropic glutamate receptors in brain function and pathology. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 14, p. 13-20, 1993.
- SCHOEPP, D. D. & JOHNSON, B. G. Excitatory amino acid agonist-antagonist interactions at 2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive quisqualate receptors coupled to phosphoinositides hydrolysis in slices of rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 50, p. 1605-1613, 1988.
- SCHOEPP, D., BOCKAERT, J., SLADDECZEK, F., **The Pharmacology of the Excitatory Amino Acids**, D. Lodge e G.L. Collingridge (Eds), 74-78, Elsevier Trends Journals, Cambridje, UK, 1991.
- SCHOEPP, D.D. & JOHNSON, B.G. Excitatory amino acid agonist-antagonist interactions at 2-amino-4-phosphonobutyric acid-sensitive quisqualate receptors coupled to phosphoinositide hydrolysis in slices of rat hippocampus. **J. Neurochem.**, v. 50, p. 1605-1613, 1988.
- SCHÖNHARTING, M. M. & SCHADE, U. F. The effect of pentoxifylline in septic shock:new pharmacologic aspects of an established drug. **J. Med. Clin. Exp. & Theo.**, v. 20, p. 97-105, 1989.
- SCHREIBER, P., SCHRÖPPEL, M., HEIDRICH, H. Effects of naftidrofuryl, pentoxifylline and bencyclane on the renal blood flow and renal excretion of conscious dogs. **Herz**, v. 15, p. 195-201, 1983.

- SCHUBERT, P., OGATA, T., MARCHINI, C., FERRONI, S., RUDOLPHI, K. Protective mechanisms of adenosine in neurons and glial cells. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 825, p. 1-10, 1997.
- SCHWARZKROIN, P. A. & WESTER, K. Long-lasting facilitation of a synaptic potential following tetanization in the in vitro hippocampal slice. **Brain Res.**, v. 89, p. 107-119, 1975.
- SCHWEIGER, H. & ORTMEIER, C. J. Treatment of chronic occlusive arterial disease with pentoxifylline: changes in clinical and haemodynamic parameters. **Pharmatherapeutica**, v. 5, p. 298-304, 1989.
- SEEBURG, P. H. The TINS/TIPS lecture: The molecular biology of mammalian brain. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 294, p. 185-199, 1991.
- SEEGERS, A.J. M., JAGER, L. P., ZANDBERG, P., VAN NOORDWIJK, J. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of non-narcotic analgesic drug mixtures in rats. **Arch. Int. Pharmacodyn**, v. 251, p. 237-254, 1981.
- SHANK, R. P. & APRISON, M. H. Present status and significance of the glutamine cycle in CNS tissue. **Life Sci.**, v. 28, p. 837-842, 1981.
- SILVER, J. & SIDMAN, R. L. A mechanism for the guidance and topographic patterning of retinal ganglion cell axons. **J. Comp. Neurol.**, v. 189, p. 101-111, 1980.
- SIMON, R. & NOSZEK, J.C. Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. **Neuron**, v. 1, p. 279-287, 1988.
- SIMON, R. P., SWAN, J. H., GRIFFITHS, T., MELDRUM, B. S. Blockade of *N*-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. **Science**, v. 226, p. 850-852, 1984.
- SINHA, B., SEMMLER, J., EISENHUT, T., EIGLER, A., ENDRES, S. Enhanced tumor necrosis factor suppression and cyclic adenosine monophosphate accumulation by combination of phosphodiesterase inhibitors and prostanoids. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 147-153, 1995.

- SIRVIO, J. Strategies that support declining cholinergic neurotransmission in Alzheimer's disease patients. **Gerontology**, v. 45 (Suppl. 1), p. 3-14, 1999.
- SMELLIE, F. W., DAVIS, C. W., DALY, J. W., WELLS, J. N. Alkylxanthines: inhibition of adenosine-elicited accumulation of cyclic AMP in brain slices and of brain phosphodiesterase activity. **Life Sci.**, v. 24, p. 2475-2482, 1979.
- SMITH R. V, WALTER, E. S., DOLUISIO, J. T., BANZER, M. T., PURI, S. K. *et al.* Pharmacokinetics of orally administered pentoxifylline in humans. **J. Pharmaceutical Sci.**, v.75, p. 47-52, 1986
- SMITH, S. E., MELDRUM, B. S. Cerebroprotective effect of a non-N-methyl-D-aspartate antagonist, NBQX, after focal ischaemia in the rat. **Funct. Neurol.**, v. 8, p. 43-8, 1993.
- SMITH-SWINTOSKY, V. L., PETTIGREW, L. C., CRADDOCK, S. D., CULWELL, A. R., RYDEL, R. E., MATTSON, M. P. Secreted forms of  $\beta$ -amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. **J. Neurochem.**, v. 63, p. 781-784, 1994.
- SNYDER, S. H. & BREDT, D. S. Nitric oxide as a neuronal messenger. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 12, p.125-128, 1991.
- SOLERTE, S. B., FIORAVANTI, M., BOZZETTI, A. Pentoxifylline, albumin excretion rate and proteinuria in type I and II diabetic patients with microproteinuria. Results of a short term randomised study. **Acta Diabetologica Latina**, v. 23, p. 171-176, 1986
- SORIA, J., LANCRENON, S., CHASSOUX, G. Fibrinogen and pentoxifylline. Results of a French cooperative exploratory study of stage II arteritis (in French). **J. Mal. Vasc.**, v. 14 (Suppl. A), p. 29-34, 1986.
- SOSSIN, W. S. Mechanisms for the generation of synapse specificity in long-term memory: The implications of a requirement for transcription. **Trends in Neurosci.**, v. 19, p. 215-218, 1996.

- SPECIVZEVA, V. G., KASABJAN, I. N., MAMAIEVA, G. G., KUKES, V. G.. Treatment of microcirculation disorders with Trental and Complatum in patients with diabetis mellitus. **Sovetskaja Medicina**, v.2 , p.64-69,1980.
- SPINK, D. C. & MARTIN, D. L. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis. **Ann. Neurol.**, v. 29, p. 110, 1991.
- SQUIRE, L. R. & KNOWLTON, B. J. Memory , hippocampus, and brain systems. In **The Cognitive Neurosciences**, M. S. Gazzaniga (ed.), MIT Press, Cambridge, MA, 1994, p. 825-837.
- SQUIRE, L. R. **Memory and Brain**. Oxford: Oxford Univ. Press, 1987.
- STAUBLI, U., THIBAUT, O., DILORENZO, M., LYNCH, G. Antagonism of NMDA receptors impairs acquisition but not retention of olfactory memory. **Behav. Neurosci.**, v. 103, p. 54-60, 1989.
- STECHER, V. J. & THORBECKE, G. J. Sites of synthesis of human serum proteins. I. Serum proteins produced by macrophages *in vitro*. **J. Immunol.**, v. 99, p. 643-652, 1967.
- STEFANOVICH, V. & JOHN, J. P. Influence of pentoxifylline on brain metabolism of normal and anoxic rats. **Arzneimittel-Forschung**, v. 28, p. 2097-2099, 1978.
- STEFANOVICH, V. The biochemical mechanism of action of pentoxifylline. **Pharmatherapeutica**, v.2 (suppl. 1), p. 5-16, 1978.
- STEWART, M. G., BOURNE, R. C., STEELE, R. J. Quantitative radioautographic demonstration of changes in binding to NMDA-sensitive [<sup>3</sup>H]glutamate and [<sup>3</sup>H]MK801, but not [<sup>3</sup>H]AMPA receptors in chick forebrain 30 min after passive avoidance training. **Eur. J. Neurosci.**, v. 4, p. 936-943, 1992.
- STEWART, P. A. & WILEY, M. J. Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells: A study using quail-chick transplantation chimeras. **Dev. Biol.**, v. 84, p. 184-192, 1981.
- STRIETER, R. M., REMICK, D. G., WARD, P. <sup>a</sup>, SPENGLER, R. N., LYNCH, J. P., LARRICK, J., KUNKEL, S. L. Cellular and molecular regulation of tumor



- necrosis factor-alpha production by pentoxifylline. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 155, p. 1230-1236, 1988.
- SU, J. Y. & HASSELBACH, W. Caffeine-induced calcium release from isolated sarcoplasmic reticulum of rabbit skeletal muscle. **Pfluegers Arch.**, v. 400, p. 14-21, 1984.
- SUTHERLAND, E. W. & RALL, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. **J. Biol. Chem.**, v. 232, p. 1077-1091, 1958.
- SUTHERLAND, R. J., KOLB, B., WHISHAW, I. Q. Spatial mapping definitive disruption by hippocampal or medial frontal cortical damage in the rat. **Neurosci. Lett.**, v. 31, p. 271-276, 1982.
- SUTHERLAND, R. J., WHISHAW, I. Q., KOLB, B. A behavioral analysis of spatial localization following electrolytic, kainate-or colchicine-induced damage to the hippocampal formation in the rat. **Behav. Brain Res.**, v. 7, p. 133-153, 1983.
- SUTHERLAND, R. J., WHISHAW, I. Q., REGEHR, J. C. Cholinergic receptor blockade impairs spatial localization by use of distal cues in the rat. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 96, p. 563-573, 1982.
- SWAN, J. H. & MELDRUM, B. S. Protection by NMDA antagonists against selective cell loss following transient ischaemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 10, p. 343-351, 1990.
- SWEENEY, M. L., YAGER, J. Y., WALZ, W., JUURLINK, B. H. Cellular mechanisms involved in brain ischemia. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 73, p. 1525-1535, 1995.
- TAFT, W. C., CLIFTON, G. L., BLAIR, R. E., DeLORENZO, R. J. Phenytoin protects against ischemia-produced neuronal cell death. **Brain Res.**, v. 483, p. 143-148, 1989.
- TAMATANI, M., CHE, Y. H., MATSUZAKI, H., OGAWA, S., OKADO, H., MIYAKE, S., MIZUNO, T., TOHYAMA, M. Tumor necrosis factor induces

- Bcl-2 and Bcl-x expression through NfkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 8531-8553, 1999.
- TANAKA, K., GOTOH, F., TOMICA, M., SATO, T., AMANO, T., TANAHASHI, N., KOBARI, M. Acceleration of regional flow through feline ischemic tissue following intravenous administration of pentoxifylline. **Proc. of the 28<sup>th</sup> International Congress of Physiological Sci.**, Tübingen, West Germany, 1980.
- TANAKA, Y., SAKURAI, M., GOTO, M., HAYASHI, S. Effect of xanthine derivatives on hippocampal long-term potentiation. **Brain Res.**, v. 522, p. 63-68, 1990.
- TANAKA, Y., SAKURAI, M., HAYASHI, S. Effect of scopolamine and HP 029, a cholinesterase inhibitor, on long-term potentiation in hippocampal slices of the guinea pig. **Neurosci. Lett.**, v. 98, p. 179-183, 1989.
- TANG, C-M. & ORKAND, R. K. Glutamate depolarization of glial cells in Necturus optic nerve. **Neurosci. Lett.**, v. 63, p. 300-304, 1986.
- TARKOWSKI, E., ROSENGREN, L., BLOMSTRAND, C., WIKKELSO, C., JENSEN, C., EKHOLM, S., TAROWSKI, A. Intrathecal release of pro-and anti-inflammatory cytokines during stroke. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 110, p. 492-499, 1997.
- TERRY, R. D. & DAVIES, P. Dementia of the Alzheimer type. **Ann. Rev. Neurosc.**, v. 3, p. 77-95, 1980.
- TERRY, R. D., MASLIAH, E., HANSEN, L. A. Structural basis of the cognitive alterations in Alzheimer disease. In: Terry R. D., Katzman, R., Bick, K. L. (Eds.), **Alzheimer disease**, Raven Press, New York, 1994, p. 179-196.
- THAYER, S.A., HIRNING, L. D. MILLER, R. J. The role of caffeine-sensitive calcium stores in the regulation of the intracellular free calcium concentration in rat sympathetic neurons *in vitro*. **Mol. Pharmacol.**, v. 34, p. 664-673, 1988a.

- THAYER, S.A., PERNEY, T. M., MILLER, R. J. Regulation of calcium homeostasis in sensory neurons by bradykinin. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 4089-4097, 1988b.
- THOMPSON, R. F & KRUPA, D. J. Organization of memory traces in the mammalian brain. **Ann. Rev. Neurosci.**, v. 17, p. 519-549, 1994.
- THOMSON, G. J., THOMSON, S., TODD, A. S., VOHRA, R. K., CARR, M. H., WALKER, M. G. Combined intravenous and oral pentoxifylline in the treatment of peripheral vascular disease. A clinical Trail. **Int. Angiol.**, v. 9, p. 266-270, 1990.
- TOCCO, G., DEVGAN, K., HANGE, S. A., WEISS, C. A., BAUDRY, M., THOMPSON, R. F. Classical conditioning selectively increases AMPA receptor binding in rabbit hippocampus. **Brain Res.**, v. 559, p. 331-336, 1991.
- TOKUDA, M., HATASE, O. Regulation of neuronal plasticity in the central nervous system by phosphorylation and dephosphorylation. **Mol. Neurobiol.**, v. 17, p. 137-156, 1998.
- TOMINAGA, Y., NAKAMURA, Y., TSUJI, K., SHIBATA, T., KATAOKA, K. Ibudilast protects against neuronal damage induced by glutamate in cultured hippocampal neurons. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 23, p. 519-523, 1996.
- TOMS, N. J., ROBERTS, P. J., SALT, T. E., STATON, P. C. Latest eruptions in metabotropic glutamate receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 17, p. 429-435, 1996.
- TOVEY, K. C., OLDHAM, K. G., WHELAN, J. A. M. A simple direct assay for cyclic AMP in plasma and other biological samples using an improved competitive protein binding technique. **Clin. Chim. Acta**, v. 56, p. 221-234, 1974.
- TROMBLEY, P.Q. & WESTBROOK, G.L. L-AP4 inhibits calcium currents and synaptic transmission via a G-protein-coupled glutamate receptor., **J. Neurosci.**, v. 12, p. 2043-2050, 1992.

- TROTTA, E. E. & FREIRE, G. L. Inhibition by caffeine of calcium uptake by brain microsomal vesicles. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 32, p. 791-793, 1980.
- TRUDEAU, L. E., FOSSIER, P., BAUX, G., TAUC, L. Xanthine derivatives IBMX and S-9977-2 potentiate transmission at an *Aplysia* central cholinergic synapse. **Brain Res.**, v. 586, p. 78-85, 1992.
- TUCHEY, J. A., PARRY, B. R., McCALL, J. L. Methylxanthines in surgery: a bright future? **Aust. N. Z. J. Surg.**, v. 62, p. 250-255, 1992.
- UEMURA, Y., KOWALL, N. W., BEAL, M. F. Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide Y neurons in ischemic gerbil striatum. **Ann. Neurol.**, v. 27, p. 620-625, 1990.
- VACCARINO, F., GUIDOTTI, A., COSTA, E. Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 8707-8711, 1987b.
- VADIEI, K., BRUNNER, L. J., LUKE, D. R. Effect of pentoxifylline in experimental acute renal failure. **Kidney Int.**, v. 36, p. 466-470, 1989.
- VADIEI, K., TUCKER, S. D., LOPEZ-BERENSTEIN, G. L., WASAN, K. M. Nephroprotective mechanism(s) of pentoxifylline: reduction of erythrocyte-mediated vascular congestion and inhibition of nitric oxide release. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 78, p. 174-180, 1996.
- VAN CALKER, D., MILLER, M., HAMPRECHT, B. Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. **J. Neurochem.**, v. 33, p. 999-1005, 1979.
- VELAZQUEZ, J. L. P., FRANTSEVA, M. V., CARLEN, P. L. *In vitro* ischemia promotes glutamate-mediated free radical generation and intracellular calcium accumulation in hippocampal pyramidal neurons. **J. Neurosci.**, v. 17, p. 9085-9094, 1997.
- VERITY, M. A. Mechanisms of phospholipase A2 activation and neuronal injury. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 679, p. 110-120, 1993.

- VIANA, M. B., TOMAZ, C., GRAEFF, F. G. The elevated T-Maze: A new animal model of anxiety and memory. **Pharmacol. Bioch. Behav.**, v. 49, p. 549-554, 1994.
- VILLIGER, J. W. & CHUTE, D. L. Papaverine facilitates passive avoidance in mice. **Soc. Neurosci. Abstr.**, 1979.
- VILLIGER, J. W. & DUNN, A. J. Phosphodiesterase inhibitors facilitate memory for passive avoidance conditioning. **Behav. Neural Biol.**, v. 31, p. 354-359, 1981.
- VINEGAR, R., TRUAX, J. F., SELPH, J. L., WELCH, R. M., WHITTE, H. L. Potentiation of the anti-inflammatory and analgesic activity of aspirin by caffeine in the rat. **Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 151, p. 556-560, 1976.
- VOLPE, C., MINUTILLO, S., BIANCHINI, D. [Rendu-Osler-Weber disease. A clinical case]. **G. Clin. Med.**, v. 69, p. 781-783, 1988.
- VON LUBITZ, D. K., PAUL, I. A., BARTUS, R. T., JACOBSON, K. A. Effects of chronic administration of adenosine A<sub>1</sub> receptor agonist and antagonist on spatial learning and memory. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 249, p. 271-280, 1993.
- WALLIS, R. A., PANIZZON, K., WASTERLAIN, C. G. Inhibition of nitric oxide synthase protects against hypoxic neuronal injury [published erratum appears in *Neuroreport* 1992 Sep;3(9):following 814], **Neuroreport**, v. 3, p. 645-648, 1992.
- WARBURTON, D. M. & WESNES, K. Drugs as research tools in psychology: drugs and information processing. **Neuropsychobiology**, v. 11, p. 121-132, 1984.
- WARD, A & CLISSOLD, S. P. Pentoxifylline. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and its therapeutic efficacy. **Drugs**, v. 34, p. 50-97, 1987.
- WASAN, K. M., VADIEL, K., LOPEZ-BERENSTEIN, G., VERANI, R. R., LUKE, D. R. Pentoxifylline in amphotericin-B toxicity rat model. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 34, p. 241-244, 1990.

- WATANABE, H., FURUKAWA, Y., CHIBA, S. Cardiovascular effect of aminophylline and pentoxifylline on intact dogs and isolated dog atria. **Jpn. Heart J.**, v. 23, p. 235-243, 1982.
- WATKINS, J. C. & EVANS, R. H. Excitatory amino acid transmitters. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 21, p. 165-204, 1981.
- WATKINS, J. C. & OLVERMAN, H. J. Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 265-272, 1987.
- WEBER, A. & HERZ, R. The relationship between caffeine contracture of intact muscle and the effect of caffeine on reticulum. **J. Gen. Physiol.**, v. 52, p. 750-759, 1968.
- WEIGANT, V. M., DUNN, A. J., GISPEN, W. H. ACTH-like neurotropic peptides: possible regulators of rat brain cyclic AMP. **Brain Res.**, v. 168, p. 565-584, 1979.
- WEIR, R. L. & HRUSKA, R. E. Interaction between methylxanthines and the benzodiazepine receptor. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 265, p. 42-48, 1983.
- WEISS, J. H., HARTLEY, D. M., KOH, J., CHOI, D. W. The calcium channel blocker nifedipine attenuates slow excitatory amino acid neurotoxicity. **Science**, v. 247, p. 1474-1477, 1990.
- WEITGASSER H. The use of pentoxifylline (Trental 400) in the treatment of leg ulcers: results of a double-blind trial. **Pharmatherapeutica**, v. 3(1), p. 143-151, 1983.
- WELLER, M., MARINI, A. M., FINIELS-MARLIER, F., MARTIN, B., PAUL, S. M. MK-801 and memantine protect cultured neurons from glutamate toxicity induced by glutamate carboxypeptidase-mediated cleavage of methotrexate. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 248, p. 303-312, 1993.
- WESTBROOK, G. L. & MAYER, M. L. Micromolecular concentrations of Zn<sup>2+</sup> antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. **Nature**, v. 328, p. 640-643, 1987.

- WHISHAW, I. Q., O'CONNOR, W. T., DUNNET, S. B. Disruption of central cholinergic systems in the rat by basal forebrain lesions or atropine: Effects on feeding, sensorimotor behavior, locomotor activity and spatial navigation. **Behav. Brain Res.**, v. 17, p. 103-115, 1985.
- WHITEHOUSE, P. J. Cholinergic therapy in dementia. **Acta Neurol. Scan.**, v. 149 [supl. 149], p. 42-45, 1993.
- WHITEHOUSE, P. J., MARTINO, A. M., ANTUONO, P. G., LOWENSTEIN, P. R., COYLE, J. T., PRICE, D. L., KELLAR, K. L. Nicotinic acetylcholine binding sites in Alzheimer's disease. **Brain Res.**, v. 371, p. 146-151, 1986.
- WHORTON, A. R., COLLAWN, J. B., MONTGOMERY, M. E., YOUNG, S. L., KENT, R. S. Arachidonic acid metabolism in cultured aortic endothelial cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 34, p. 119-123, 1985.
- WILBUR, K. M., BERNHEIM, F., SHAPIRO, O. W. The thiobarbituric acid reagent as a test for the oxidation of unsaturated fatty acids by various agents. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 24, p. 305-313, 1949.
- WILLIAMS, S. H. & JOHNSTON, D. Hippocampal CA3 mossy fiber LTP is blocked by postsynaptic calcium chelators. **Soc. Neurosci. Abst.**, v. 15, p. 399, 1989.
- WILLIS, R. J., WALLER, E. S., PURI, S. K., HO, I., YAKATAN, G. J. Influence of food on the bioavailability of trental (pentoxifylline) in man. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 7, p. 385-396, 1981.
- WILLNER, J., GALLAGHER, M., GRAHAM, P. W., CROOKS, G. B. N-methyl-D-aspartate antagonist D-APV selectively disrupts taste-potentiated odor aversion learning. **Behav. Neurosci.**, v. 106, p. 315-323, 1992.
- WINBLAD, B., HARDY, J., BACKMAN, L., NILSSON, L. -G. Memory function and brain biochemistry in normal aging and senile dementia. In D. S. Olton, E. Gamzu & Corkin (Eds.), **Memory dysfunction: An integration of animal and human research from preclinical and clinical perspectives** (Annals of the

- New York Academy of Sciences, vol 444, New York: New York Academy of Sciences, 1985, p. 265-268.
- WINDHOLZ, M. & BUDAVARI, S. **The Index Merck, an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**, 10<sup>th</sup> edition, Merck & CO. Inc., Rahway, N. J., USA, 1983, p. 1025-1026.
- WITTER, F. R. & SMITH, R. V. The excretion of pentoxifylline and its metabolites into human breast milk. **Am. J. Obstetrics and Gynecology**, v. 151, p. 1094-1097, 1985.
- WITTER, M. P., GROENEWEGEN, H. J., LOPES DA SILVA, F. H., LOHMANN, A. H. M. Functional organization of the extrinsic and intrinsic circuitry of the rat parahippocampal region. **Prog. in Neurobiol.**, v. 33, p. 161-253, 1989.
- WOLFMAN, C, DA CUNHA, C., JERUSALINSKY, D., LEVI DE STEIN, M. *et al.* Habituation and inhibitory avoidance training alter brain regional levels of benzodiazepine-like molecules and are affected by intracerebral flumazenil microinjection. **Brain Res.**, v. 548, p. 74-80, 1991.
- WONG, E. H. F., KEMP, J. A., PRIESTLEY, T., KNIGHT, A. R., WOODRUFF, G. N., IVERSEN, L. L. The anti-convulsant MK-801 is a potent N-methyl-D-aspartate antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 7104-7108, 1986.
- WROBLEWSKI, J. T., NICOLETTI, F., FADDA, E., COSTA, E. Phencyclidine is a negative allosteric modulator of signal transduction at two subclasses of excitatory amino acid receptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 84, p. 5068-5072, 1987.
- YAMAMOTO, C., SAWADA, S., TAKADA, S. Suppressing action of 2-amino-4-phosphonobutyric acid on mossy fiber-induced excitation in the guinea pig hippocampus. **Exp. Brain Res.**, v. 51, p. 128-134, 1983.
- YAMAUCHI, M., OMOTE, K., NINOMIYA, T. Direct evidence for the role of nitric oxide on the glutamate-induced neuronal death in cultured cortical neurons. **Brain Res.**, v. 780, p. 253-259, 1998.



- YANG, C. S., TSAI, P. J., LIN, N. N., KUO, J. S. Elevated extracellular glutamate concentrations increased malondialdehyde production in anesthetized rat brain cortex. **Neurosci. Lett.**, v. 243, p. 33-36, 1998.
- YEDNOCK, T. A., CANNON, C., FRITZ, L. C. *et al.* Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha4 $\beta$ 1 integrin. **Nature**, v. 356, p. 63-66, 1992.
- YESAVAGE, J. A., TINKLENBERG, J. R., HOLLISTER, L. E., BERGER, P. A. Vasodilators in senile dementias. **Archs. Gen. Psychiat.**, v. 36, p. 220-227, 1979.
- YIN, J. C. P. & TULLY, T. CREB and the formation of long-term memory. **Curr. Opinion in Neurobiol.**, v. 6, p. 264-268, 1996.
- YOSHIKAWA, M., SUZUMURA, A., TAMARU, T., TAKAYANAGI, T., SAWADA, M. Effects of phosphodiesterase inhibitors on cytokine production by microglia. **Mult. Scler.**, v. 5(2), p. 126-133, 1999.
- YOSHIOKA, A., HARDY, M., YOUNKIN, D. P., GRINSPAN, J. B., STERN, J. L., PLEASURE, D.  $\alpha$ -Amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors mediate excitotoxicity in the oligodendroglial lineage. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2442-2448, 1995.
- YOSHIOKA, A., SHIMIZU, Y., HIROSE, G., KITASATO, H., PLEASURE, D. Cyclic AMP-elevating agents prevent oligodendroglial excitotoxicity. **J. Neurochem.**, v. 70, p. 2416-2423, 1998.
- YOUNG, A. W., AGGLETON, J. P., HELLAWELL, D. J., JOHNSON, M., BROKS, P., HANLEY, J. R. Face processing impairments after amygdalotomy. **Brain**, v. 118, p. 15-24, 1995.
- ZABEL, P., SCHADE, F. U., SCHLAAK, M. Inhibition of endogenous TNF formation by pentoxifylline. **Immunology**, v. 187, p. 447-463, 1993.
- ZANATTA, M. S., SCHAEFFER, E., SCHMITZ, P. K., MEDINA, J. H., QUEVEDO, J., QUILLFELDT, J. A., IZQUIERDO, I. sequential involvement of NMDA-dependent mechanisms in the hippocampus, amygdala, entorhinal

- cortex and parietal cortex in memory processing. **Behav. Pharmacol.**, v. 6, p. 341-345, 1996.
- ZHANG, Y. & LIPTON, P. Cytosolic Ca<sup>2+</sup> changes during in vitro ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> release from mitochondria. **J. Neurosci.**, v. 19, p.3307-3315, 1999.
- ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R., AMARAL, D. G. Human amnesia and the medial temporal region: enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to field CA1 of the hippocampus. **J. Neurosci.**, v. 6, p. 2950-2967, 1986.
- ZOLA-MORGAN, S., SQUIRE, L. R., AMARAL, D. G., SUZUKI, W. Lesions of perirhinal and parahippocampal cortex that spare the amygdala and hippocampal formation produce severe memory impairment. **J. Neurosci.**, v. 9, p. 4355-4370, 1989.
- ZORNETZER, S. F. Neurotransmitter modulation and memory: A new neuropharmacological phenomenon? In M. A. Lipton, A. DiMascio & K. F. Killam (Eds.), **Psychopharmacology: A generation of progress** New York: Raven, 1978, p. 637-649.
- ZORUMSKI, C. F. & THIO, L. L. Properties of vertebrate glutamate receptors: calcium mobilization and desensitization. **Prog. Neurobiol.**, v. 39, p. 295-336, 1992.
- ZORUMSKI, C. F., THIO, L. L., CLARK, G. D., CLIFFORD, D. B. Blockade of desensitization augments quisqualate excitotoxicity in hippocampal neurons., **Neuron**, v. 5, p. 61-66, 1990.