

VALÉRIA FERNANDES DE SOUZA

**DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR BAIXAS DOSES DE RESERPINA EM
RATOS: POSSÍVEL RELAÇÃO COM PREJUÍZOS NO PROCESSAMENTO
EMOCIONAL NA DOENÇA DE PARKINSON**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, para obtenção do Título
de mestre em Psicobiologia.**

NATAL/RN

2008

VALÉRIA FERNANDES DE SOUZA

**DÉFICITS DE MEMÓRIA INDUZIDOS POR BAIXAS DOSES DE RESERPINA EM
RATOS: POSSÍVEL RELAÇÃO COM PREJUÍZOS NO PROCESSAMENTO
EMOCIONAL NA DOENÇA DE PARKINSON**

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Rio Grande
do Norte, para obtenção do Título
de mestre em Psicobiologia.**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Regina Helena da Silva

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Alessandra Mussi Ribeiro

**NATAL/RN
ABRIL, 2008**

Divisão de Serviços Técnicos

Catálogo da Publicação na Fonte. UFRN / Biblioteca Central Zila Mamede

Souza, Valéria Fernandes de.

Déficits de memória induzidos por baixas doses de reserpina em ratos: possível relação com prejuízos no processamento emocional na doença de Parkinson / Valéria Fernandes de Souza. – Natal, RN, 2008. 53 f.

Orientador : Regina Helena da Silva.

Co-orientador: Alessandra Mussi Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Psicobiologia.

I. Psicobiologia – Dissertação. 2. Ratos – reserpina - Dissertação. 3. Doença de Parkinson - Dissertação. 4. Memória – Dissertação. I. Silva, Regina Helena da. II. Ribeiro, Alessandra Mussi. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Título.

RN/UF/BCZM

CDU 591.512(043.3)

Título: “Déficits de memória induzidos por baixas doses de reserpina em ratos: possível relação com prejuízos no processamento emocional na Doença de Parkinson”

Autor: Valéria Fernandes de Souza

Data da Defesa: 03 de abril de 2008

Banca Examinadora

Profa. Regina Helena da Silva
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

Profa. Vanessa Costhek Abílio
Universidade Federal de São Paulo, SP

Profa. Fabíola Da Silva Albuquerque
Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte pela oportunidade concedida.

A minha orientadora, Profa. Regina Helena da Silva, por acreditar e tornar possível a realização desse sonho e por sua amizade.

Ao meu marido, pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência.

À Profa. Alessandra Mussi Ribeiro pela ajuda, estímulo e por sua amizade.

Aos meus colegas do Laboratório de Estudo de Memória (LEME), pela contribuição nos experimentos e amizade.

A minha família, em especial minha mãe, pelo seu apoio e amor incondicional que sempre me incentivaram na busca da realização de meus sonhos. Meu pai, que sempre cultivou na minha criação a busca pela curiosidade e estudos, obrigada.

Aos meus amigos de BH e da AMBEP pelo apoio e amizade.

Enfim, a todos que diretamente ou indiretamente me ajudaram a concluir esse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	01
Abstract	02
1. Introdução ,.....	03
2. Justificativa e Objetivos	07
3. Materiais e métodos	08
3.1. <i>Animais</i>	08
3.2. <i>Tratamento farmacológico</i>	08
3.3. <i>Procedimentos</i>	09
3.3.1. <i>Experimento I: Tarefa de reconhecimento de objetos</i>	09
3.3.2. <i>Experimento II: Tarefa de memória operacional (alternação espontânea)</i>	10
3.3.3. <i>Experimento III: Tarefa de medo condicionado ao contexto (Freezing)</i>	10
3.4. <i>Análise estatística</i>	11
4. Resultados	12
4.1. <i>Experimento I: Tarefa de reconhecimento de objetos</i>	12
4.2. <i>Experimento II: Tarefa de memória operacional (alternação espontânea)</i>	14
4.3. <i>Experimento III: Tarefa de condicionamento de medo contextual (Freezing)</i>	15
5. Discussão e Conclusão	16
6. Artigo submetido à publicação	21
7. Referências Bibliográficas adicionais	47

RESUMO

Recentemente verificamos que a administração de reserpina (que causa depleção de monoaminas) em doses que não afetam a função motora, levou a prejuízos na memória em roedores submetidos à tarefa de esquiva discriminativa. Em conjunto com dados da literatura, esses resultados sugerem que o efeito amnésico da reserpina em ratos pode ser uma abordagem adequada para o estudo dos sintomas cognitivos da doença de Parkinson.

No presente estudo, foram investigados os efeitos da reserpina (0,1 - 0,5 mg/Kg) no desempenho de ratos no reconhecimento de objetos, na memória operacional espacial (alternação espontânea) e na memória emocional (condicionamento contextual de medo). O reconhecimento de objetos e a alternação espontânea não foram afetados pelo tratamento com reserpina, ao contrário do condicionamento contextual de medo, que foi prejudicado. Associados a estudos prévios, esses resultados sugerem que uma depleção moderada de monoaminas pode preferencialmente induzir déficits em tarefas que envolvem contextos emocionais. Dessa forma, é possível que haja uma relação entre déficits cognitivos e processamento emocional na doença de Parkinson.

Palavras chaves : reserpina , Doença de Parkinson, memória, emoção, modelo animal

ABSTRACT

We have recently verified that the monoamine depleting drug reserpine – at doses that do not modify motor function - impairs memory in a rodent model of aversive discrimination. In this study, the effects of reserpine (0.1-0.5 mg/kg) on the performance of rats in object recognition, spatial working memory (spontaneous alternation) and emotional memory (contextual freezing conditioning) tasks were investigated. While object recognition and spontaneous alternation behavior were not affected by reserpine treatment, contextual fear conditioning was impaired. Together with previous studies, these results suggest that mild monoamine depletion would preferentially induce deficits in tasks involved with emotional contexts. Possible relationships with cognitive and emotional processing deficits in Parkinson disease are discussed.

Keywords: reserpine, Parkinson Disease, memory, emotion, animal model

1. Introdução

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez por James Parkinson em 1817 (2002). É um dos transtornos cerebrais neurodegenerativos mais comuns, atingindo em torno de 1% da população com 65 anos ou mais (Mayeux, 2003). Essa neuropatologia é classicamente definida por transtornos motores como tremores, bradicinesia e rigidez (Korczyn, 2001, Nieoullon, 2002). Contudo, existem outras manifestações sintomáticas além das motoras, dentre as quais podemos citar alterações na cognição, no humor e no sistema sensorial (Higginson et al., 2001; Korczyn, 2001; Richard et al., 2004; Zgaljardic et al., 2004; Perbal et al., 2005; Shohamy et al., 2005; Koerts et al., 2007; Monchi et al., 2007; Huang et al., 2007; Schmitt-Eliassen et al., 2007).

Dentre os sintomas cognitivos presentes em pacientes parkinsonianos estão incluídos disfunções executivas, particularmente a memória operacional, planejamento e soluções de problemas (Karel et al., 1996; Owen et al., 1998; Cox et al., 2002; Cools et al., 2002; Higginson et al., 2003; Lewis et al., 2003; 2005; Monchi et al., 2007; Nieoullon, 2002; Zgaljardic et al., 2004). Além disso, também são encontrados em pacientes com DP alterações na associação de resposta a estímulos (Shohamy et al., 2005; Nagy et al., 2007); aprendizagem implícita (Schneider et al., 2003; Castner et al., 2007); aprendizagem por “feed-back” (Schmitt-Eliassen et al., 2007); e memória espacial (Pillon et al., 1996; 1997a,b; Giraudo et al., 1997).

A progressiva degeneração dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais caracteriza primariamente a fisiopatologia da DP. Quando os neurônios dopaminérgicos da Substância negra são perdidos e se tem uma depleção dos níveis de dopamina

estriatal surgem sintomas como a acinesia, rigidez e tremor (Johnston et al., 1999; Lindner et al., 1999; Ridley et al., 2006). Contudo, os distúrbios motores são acompanhados também por prejuízos intelectuais que afetam significativamente a qualidade de vida de uma pessoa acometida (Korczyn, 2001; Nieoullon, 2002; Scherfler et al., 2004; Zgaljardic et al., 2004). Esses prejuízos não parecem estar relacionados com os sintomas motores e têm sido correlacionados com disfunções nas projeções das vias dopaminérgicas envolvidas no controle de funções de áreas fronto-corticais, tais como planejamento de ações e a memória operacional (Pillon et al., 1997; Pillon et al., 1997a ; Colls et al., 2002). Os déficits cognitivos geralmente não respondem ao tratamento farmacológico que controla os sintomas motores (Fenelon, 1997), e estudos sugerem que tais sintomas podem se manifestar antes do surgimento dos sinais motores (Fenelon, 1997; Shults, 2003).

Estudos de neuroimagem em pacientes com Parkinson sugerem uma base neural específica para os danos cognitivos encontrados nesses casos clínicos (Owen et al., 1998; Cools et al., 2002; Koerst et al., 2007). Conforme já mencionado, esses déficits cognitivos na DP têm sido freqüentemente atribuídos a prejuízos em projeções dopaminérgicas corticais (Crofts et al., 2001; Cools et al., 2002). Contudo, outras evidências sugerem que os déficits também podem estar relacionados a danos em regiões subcorticais (Pillon et al., 1996; Pillon et al., 1997; Crofts et al., 2001; Cools et al., 2006).

Modelos animais vêm sendo utilizados para estudar as alterações causadas pela DP. Um dos modelos utilizados é a administração de reserpina em roedores, sugerida como um modelo farmacológico da DP, baseado nos efeitos de agentes de depleção de monoaminas sobre a atividade motora (Colpaert, 1987; Kim et al., 1999; Alves et al.,

2000; Silva et al., 2002; Skalisz et al., 2002). A reserpina é uma droga que evita o armazenamento de monoaminas nas vesículas sinápticas através da inibição da ação dos transportadores da membrana que captam as monoaminas para dentro da vesícula (Liu et al., 1996; Verheij & Cools, 2007). Dessa forma, as vesículas sinápticas permanecem vazias e conseqüentemente não há neurotransmissores para serem liberados na fenda sináptica quando um potencial de ação atinge o botão sináptico (Rang & Dale, 2004). A depleção de dopamina estriatal promove sinais parkinsonianos como acinesia, rigidez, tremores e déficits cognitivos visuoespaciais (Johnston et al., 1999; Lindner et al., 1999; Delfino et al., 2004). Contudo, é importante ressaltar que o tratamento com reserpina como um modelo de DP apresenta limitações, pois a administração da droga não provoca depleção de neurotransmissores apenas na via nigroestriatal e nem age exclusivamente em vias dopaminérgicas.

Devido à importância dos sintomas cognitivos, da relativa desabilidade produzida pela DP e do possível prognóstico, alguns estudos têm descrito prejuízos de desempenho em testes de memória em roedores ou modelos de primatas não-humanos para essa doença (Alves et al., 2000; Silva et al., 2002; Skalisz et al., 2002; Milton et al., 2004; Carvalho et al., 2006). Carvalho et al. (2006) demonstraram que os efeitos da reserpina induzem um prejuízo no desempenho da memória na esquiwa discriminativa em labirinto em cruz elevado, uma tarefa que associa uma estimulação aversiva com um determinado local do labirinto. É importante ressaltar que nesse estudo (Carvalho et al., 2006), foram utilizadas doses de reserpina menores que as usuais (0,1 a 0,5 mg/kg) e que o comprometimento cognitivo foi observado mesmo em doses que não afetaram a função motora. O fato de doses pequenas de reserpina induzirem déficits cognitivos mas não diminuição da atividade motora está de acordo com a observação de que

déficits cognitivos podem preceder os sinais motores tanto em pacientes com DP (Cooper et al., 1991; Owen et al., 1992) quanto em modelos animais para esse distúrbio (Schneider & Pope-Coleman, 1995; Carvalho et al., 2006). De fato, evidências sugerem que pequenas perturbações na transmissão dopaminérgica levariam a déficits cognitivos enquanto um alto nível de alteração nessa neurotransmissão levaria a déficits motores, os quais poderiam até sobrepor prejuízos cognitivos pré-existentes (Schneider & Pope-Coleman, 1995; Pillon et al., 1997; Owen et al., 1998).

Finalmente, tem sido sugerido que o efeito amnésico da reserpina em ratos submetidos a outros testes com estímulos aversivos (por exemplo: estímulo sonoro e luminoso) pode ser uma abordagem comportamental de estudo dos sintomas cognitivos da DP. Dessa forma, modelos como o da esquiva passiva e o da esquiva discriminativa em labirinto em cruz elevado tem sido utilizados (Alves et al., 2000; Skalisys et al., 2002; Silva et al., 2002; Milton et al., 2004; Carvalho et al., 2006).

2. Justificativa e Objetivos

Estudos têm sugerido um comprometimento cognitivo que ocorreria independentemente do declínio motor que é encontrado tanto em humanos com DP quanto em modelos animais desse distúrbio induzidos pela administração de reserpina. Sugere-se também que esse declínio ocorreria antes do motor (ver introdução). A maioria dos estudos que investigaram os déficits cognitivos encontrados na DP fizeram uso de tarefas aversivamente motivadas. Considerando que os prejuízos encontrados na DP estão relacionados com diversos tipos de capacidades cognitivas (Karel et al., 1996; Pillon et al., 1996; Giraudo et al., 1997; Pillon et al., 1997; Pillon et al., 1997a; Owen et al., 1998; Cools et al., 2002; Cox et al., 2002; Higginson et al., 2003; Owen, 2004; Scherfler et al., 2004; Zgaljardic et al., 2004; Lewis et al., 2005; Perbal et al., 2005; Shohamy et al., 2005; Matsui et al., 2006; Huang et al., 2007; Monchi et al., 2007; Nagy et al., 2007) e que pacientes com DP também apresentam déficits no processamento emocional (Schneider et al., 2003; Salgado-Pineda et al., 2005; Bowers et al., 2006), no presente trabalho, propomos estudar os efeitos de baixas doses de reserpina na performance de ratos testados em três modelos comportamentais que avaliam tipos diferentes de memória, relacionados ou não à associação com estímulos aversivos. Especificamente, avaliaremos:

- Memória de reconhecimento (pela tarefa de reconhecimento de objetos);
- Memória operacional (pelo modelo da alternância espontânea);
- Memória emocional (pela resposta de medo (*freezing*) condicionada ao contexto).

3. Materiais e métodos

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar adultos, com 5 meses de idade (300-500g). Todos os animais foram mantidos em grupos de cinco por gaiola em um ciclo claro/escuro de 12 h/12 h (iniciando-se a fase clara às 06:00 h), a uma temperatura constante de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com comida e água a vontade. Os ratos foram manipulados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento usadas em pesquisa com animais. Os devidos cuidados foram tomados a fim de minimizar qualquer sofrimento ou desconforto e de reduzir ao mínimo possível o número de animais utilizados.

Os ratos foram submetidos a um período de 20 minutos de manipulação durante quatro dias antes de iniciar os procedimentos experimentais. Todas as sessões foram filmadas por uma câmera colocada acima dos aparelhos comportamentais. Em todos os experimentos, os animais foram observados alternadamente entre os grupos. Entre as sessões comportamentais, os aparelhos foram limpos com uma solução de etanol a 5%.

3.2. Tratamento farmacológico

A droga utilizada foi a reserpina (ácido ester metil reserpato 3,4,5-trimetotocinamico, Sigma). A reserpina (RES) foi dissolvida em gotas de ácido acético e para atingir uma concentração correta foi diluída em água. O veículo (solução

controle, VEH) consistiu no mesmo ácido e água usados na solução de reserpina. O pH da solução foi verificado anteriormente a administração, sendo adequado ao nível biológico. Ambas as soluções foram administradas por injeção subcutânea (administração aguda) em um volume de 1 ml/kg de peso corporal. As baixas doses utilizadas no presente estudo foram escolhidas a fim de minimizar o aparecimento de prejuízos motores (Carvalho et al., 2006).

3.3. Procedimentos

3.3.1 Experimento I: Tarefa de reconhecimento de objetos

Os ratos (n = 6 - 7 por grupo) foram colocados individualmente em uma caixa aberta, com um chão retangular (57 X 43 cm) e paredes de 33 cm de altura. Em cada ângulo da caixa experimental foi posicionada um objeto diferente e estes não poderiam ser movidos pelos ratos. Os objetos utilizados foram dois tubos de PVC (um de 10 cm e outro de 3 cm de diâmetro), uma garrafa plástica de 250 ml desfiada em forma de um chafariz, uma caixa plástica, uma escova de plástico de lavar roupas e uma cumbuca. A sala continha pistas espaciais localizados fora da caixa experimental.

Na sessão de treino (primeira sessão), os ratos eram colocados durante dez minutos na caixa, explorando livremente os objetos. Na segunda sessão (teste), vinte e quatro horas depois do treino, dois objetos que estavam em sentido diagonal foram trocados por novos e os ratos foram recolocados por dez minutos. Novamente eles ficaram livres para explorar os objetos. O tempo de exploração de cada objeto foi registrado. Foram considerados comportamentos exploratórios: cheirar, tocar e morder.

3.3.2. Experimento II: Tarefa de memória operacional (alternação espontânea)

Vinte e quatro horas após as injeções, os ratos (5 - 7 por grupo) foram colocados individualmente no labirinto em cruz, constituído de quatro braços fechados de 47 X 16 X 34 cm com o telhado aberto, e um espaço central aberto (plataforma central – 16 X 16 cm). O labirinto foi elevado a uma altura de 50 cm. Os ratos foram colocados no centro do labirinto para explorar livremente, durante dez minutos. Durante esse tempo eles alternavam espontaneamente entre os quatro braços utilizando informações dos braços previamente visitados e pistas fora do labirinto (no ambiente em que o labirinto estava), constituindo assim uma memória espacial de trabalho. Os braços do labirinto foram individualmente nomeados A, B, C e D. Dessa forma, para a realização do teste de alternação espontânea foi registrada manualmente a seqüência de entradas nos braços (Ex: ABCBADDC). Posteriormente, foi realizada uma análise dos registros determinando a porcentagem de alternação e entradas nos braços. Dessa forma, o número máximo de alternações possíveis seria o total de entradas nos braços menos três, e o percentual de alternações foi calculado através do total de alternações/máximo de alternações x 100.

3.3.3. Experimento III: Tarefa de medo condicionado ao contexto (Freezing)

Nos dois experimentos anteriores não foram observados efeitos significativos da reserpina na memória. Assim sendo, apenas as duas maiores doses de reserpina foram utilizadas nesse experimento. Para avaliar o desempenho dos animais na tarefa de medo condicionado ao contexto, os ratos foram colocados individualmente em uma

caixa (23 X 20 cm) onde o chão era constituído por grades (15 mm de distância) por onde poderia ou não ser aplicada uma corrente elétrica. Na sessão de treino, 24 horas após às injeções, os ratos (n = 6 por grupo) foram colocados individualmente na caixa e após 150 segundos estes passaram a receber seis choques de intensidade moderada (0,3 mA por 2 segundos a cada 30 segundos até completar os 5 minutos da sessão). Após o término do último choque o animal era retirado da caixa.

Vinte a quatro horas após o treino, na sessão de teste, os animais foram recolocados no aparato, por 5 minutos, porém sem nenhum estímulo (choque). O tempo do comportamento de congelamento (*freezing*), definido como a completa ausência de movimentos exceto pela respiração, foi quantificado.

3.4. Análise estatística

Nos experimentos, os efeitos da reserpina no desempenho dos ratos foram analisados pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Duncan*. No experimento I, utilizamos o teste *t* para amostras pareadas para as comparações dentro dos grupos no desempenho da exploração de objetos velhos X objetos novos em cada grupo. Os resultados foram expressos em médias \pm E.P. O nível de significância considerado, em todos os testes, foi de 5%.

4. Resultados

4.1. Experimento I: Tarefa de reconhecimento de objetos

Não observamos diferença significativa entre os grupos quanto à porcentagem de tempo gasto na exploração dos objetos novos na sessão teste ($p = 0,50$) (Figura 1A). Além disso, foi observado que todos os grupos apresentaram um aumento na exploração dos novos objetos quando comparados com os velhos objetos ($t = 3,06$; $2,70$; $2,67$; $3,46$ e $p = 0,028$; $0,036$; $0,044$; $0,011$ para VEH, RES 0,1, RES 0,25 e RES 0,5, respectivamente, Figura 1B).

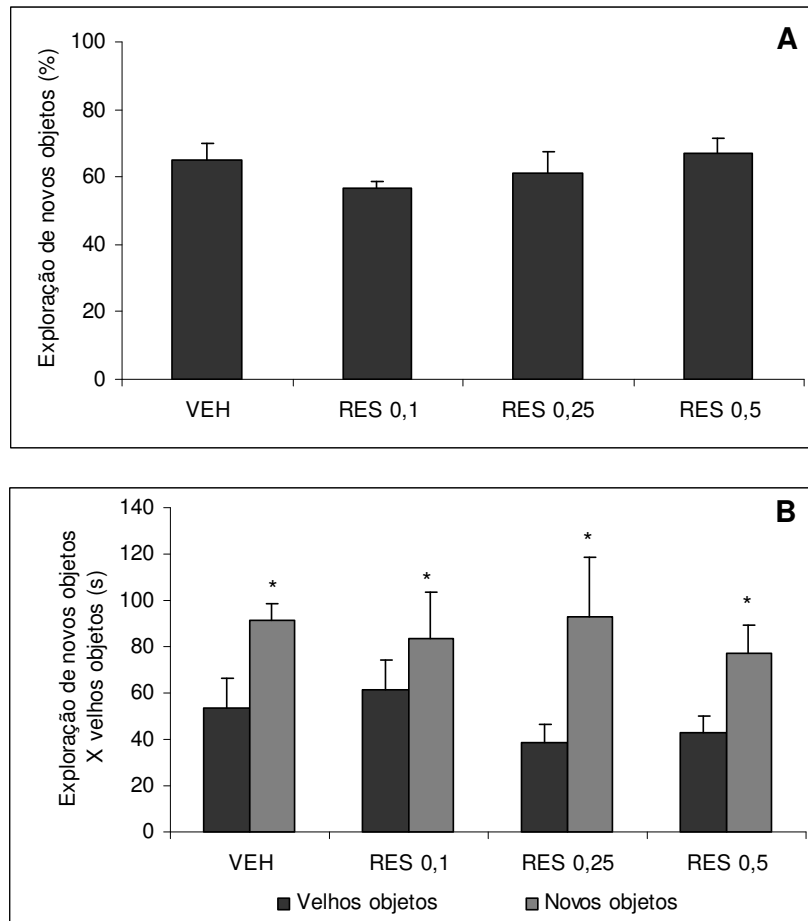


Figura 1: Os efeitos da reserpina (0,1; 0,25 e 0,5 mg/Kg) ou veículo na tarefa de reconhecimento de objetos. Os dados são expressos como médias \pm E.P. A figura A representa a porcentagem de tempo gasto na exploração de novos objetos na sessão teste. Figura B representa a exploração de novos objetos comparados com a exploração de velhos objetos (* $p < 0,05$ quando comparado com exploração de velhos objetos; Teste t pareado).

4.2. Experimento II: Tarefa de memória operacional (alternação espontânea)

Os ratos tratados com reserpina em todas as doses apresentaram um trabalho de alternação competente, similar ao grupo controle (Figura 2A, $p = 0,70$). Entretanto foi observado um efeito na locomoção dos animais tratados com 0,5 mg/kg de reserpina, que apresentaram significativamente menor número de entradas que o grupo controle ($p = 0,007$) (Figura 2B).

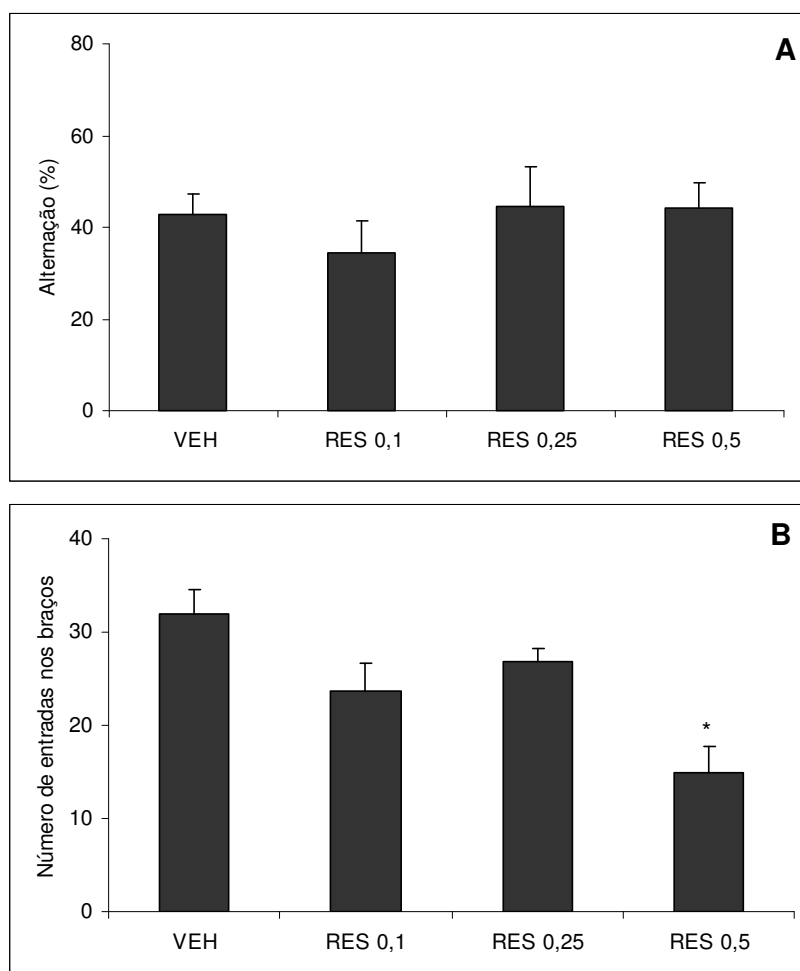


Figura 2: Os efeitos da reserpina (0,1; 0,25 e 0,5 mg/Kg) ou veículo na alternação espontânea. Os dados são expressos como médias \pm E.P. A figura A representa a porcentagem de alternação e a figura B o número total de entradas nos braços do labirinto em cruz (ANOVA e teste Duncan - * $p < 0,05$ quando comparado com o veículo).

4.3. Experimento III: Tarefa de medo condicionado ao contexto (*Freezing*)

A figura 3 demonstra o efeito do tratamento sobre o desempenho da memória de condicionamento contextual de medo que é representado pelo tempo em *freezing*. Foram observadas diferenças significativas nos grupos reserpina 0,25 e 0,5 mg/Kg quando comparados ao grupo controle ($F(2,15)=7.31$; $p= 0.006$) (Figura 3).

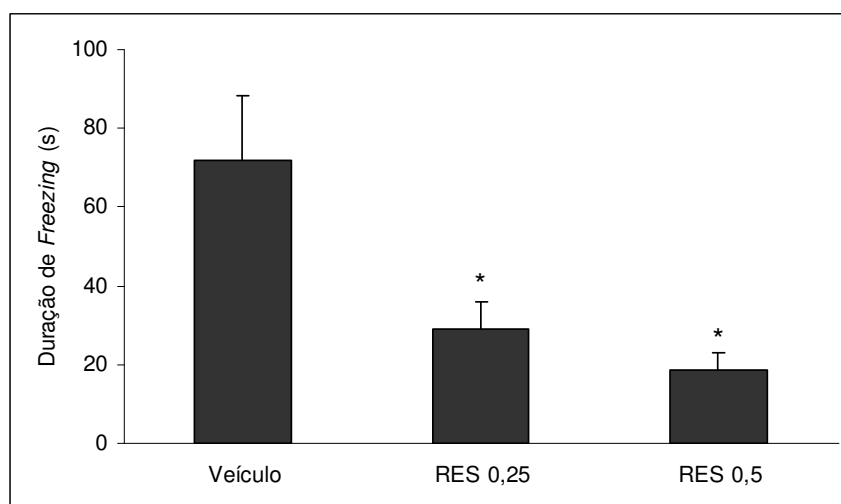


Figura 3. Os efeitos da reserpina (0,25 e 0,5 mg/Kg) ou veículo no condicionamento contextual de medo. Os dados são expressos como médias \pm E.P. * $p < 0,05$ quando comparado com o veículo (ANOVA e teste de Duncan).

5. Discussão e Conclusão

Os resultados desse estudo revelaram que o tratamento com reserpina nas doses de 0,1, 0,25 ou 0,5 mg/kg não modifica o desempenho de ratos nas tarefas de reconhecimento de objetos ou alternância espontânea. Contudo, ratos tratados com 0,25 ou 0,5 mg/kg de reserpina mostraram prejuízo no condicionamento contextual de medo. Os resultados desse último experimento corroboram nosso estudo prévio que demonstra que o tratamento com reserpina em baixas doses induz prejuízos na memória em camundongos no teste do labirinto em cruz com esquiva discriminativa sem alterar a função motora (Carvalho et al., 2006).

Como mencionado anteriormente, o fato de baixas doses de reserpina induzirem prejuízos na memória e não na motricidade em ratos está de acordo com estudos realizados em pacientes com Parkinson, mostrando que déficits cognitivos antecedem perturbações motoras (Cooper et al., 1991). Entretanto, as doses de reserpina que promoveram prejuízos na tarefa de esquiva discriminativa (Carvalho et al., 2006) ou no medo condicionado ao contexto (presente trabalho) não foram capazes de modificar o reconhecimento de objetos ou a alternância espontânea.

O teste de reconhecimento de objetos é baseado no fato do animal reconhecer um objeto previamente apresentado e dessa forma passar mais tempo explorando os objetos novos na sessão de teste. A preferência pela exploração dos objetos novos foi observada em todos os grupos, independentemente do tratamento (Figura 1), indicando que a reserpina não afetou esse tipo de memória. Deve-se ressaltar que este é o primeiro estudo que investiga o desempenho na tarefa de reconhecimento de objetos em um modelo animal de DP. Entretanto, esses resultados corroboram alguns estudos

clínicos de pacientes com DP que apresentam a memória de reconhecimento intacta (Gabrieli, 1996; Postle et al., 1997).

A tarefa de alternância espontânea objetiva avaliar a memória operacional em ratos. Essa tarefa é baseada na tendência que o roedor apresenta de explorar de forma abrangente o lugar quando é exposto a um novo ambiente, e dessa forma, tenderá a alternar entre os braços do labirinto. Foi observado que a porcentagem de alternâncias não se diferenciou entre os grupos, demonstrando mais uma vez a ausência dos efeitos da reserpina. Embora os resultados acima confirmem um estudo prévio demonstrando a ausência do efeito da reserpina na alternância espontânea em ratos (Kokkinidis & Anisman, 1976), o déficit de memória operacional parece ser um sintoma comum na DP (Dubois et al., 1994; Gabrieli, 1996; Kliegel et al., 2005; Vera-Cuesta et al., 2006). Na verdade, tem sido sugerido que prejuízos cognitivos em estágios precoces da DP se assemelham a aqueles produzidos por danos no lobo frontal, os quais incluem principalmente prejuízos em funções executivas como planejamento e memória operacional (Lewis et al., 2003, Vera-Cuesta et al., 2006). Neste sentido, como mencionado, o tratamento de reserpina apresenta limitações como um modelo animal de DP. Por outro lado, a administração da neurotoxina seletiva 6-hidroxidopamina no córtex pré-frontal também não causou alterações na alternância espontânea em ratos (Bubser & Schmidt, 1990). Esses resultados, portanto, sugerem dados conflitantes em estudos clínicos e modelos animais. Uma possível explicação para essa discrepância seria o fato de o déficit de memória operacional estar positivamente correlacionado com prejuízos motores, pelo menos em humanos (Gabrieli, 1996; Vera-Cuesta et al., 2006). Assim, um mecanismo comum subjacente a ambos os fatores (déficits motores e prejuízos na memória operacional) poderia existir. Já nos estudos com animais

supracitados, a ausência de um comprometimento motor importante poderia estar relacionada com a ausência de prejuízos na memória operacional. Mais estudos são necessários para esclarecer essa questão, embora o uso de procedimentos que induzam comprometimento da função motora provavelmente dificultaria a avaliação de tarefas baseadas na atividade exploratória.

No modelo de condicionamento contextual de medo encontramos o único déficit de memória induzido pela administração de reserpina constatado neste estudo (experimento III). Essa tarefa é baseada em um procedimento de condicionamento clássico usado para avaliar a memória emocional. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que demonstraram prejuízos no desempenho da tarefa de memória aversiva em ratos tratados com reserpina (Alves et al., 2000; Silva et al., 2002; Naidu et al., 2004), embora tais estudos tenham utilizado doses mais altas (acima de 1,0 mg/kg). Além disso, esses resultados corroboram o trabalho de Carvalho et al. (2006), no qual também foram encontrados déficits decorrentes do tratamento com doses baixas de reserpina. O fato de doses baixas de reserpina aparentemente promoverem prejuízo apenas em modelo de memória aversiva sugere o envolvimento de mecanismos de processamento emocional. Nesse sentido, déficits de processamento emocional são encontrados na DP (Schneider et al., 2003; Salgado-Pineda et al., 2005; Bowers et al., 2006). Esses déficits provavelmente estão relacionados com o fato de que pacientes parkinsonianos não apresentam evocação de informações com conotação emocional diferenciada em relação a informações neutras (Schneider et al., 2003), como seria esperado para indivíduos saudáveis (veja Phelps, 2006).

Diversos estudos sugerem que a neurotransmissão dopaminérgica desempenha um papel importante no processamento emocional (ver Salgado-Pineda et al., 2005). Foi demonstrado, por exemplo, que o antagonista de receptor D2 dopaminérgico haloperidol prejudica o desempenho de ratos tanto na tarefa de esquiva discriminativa (dados não publicados) quanto no condicionamento contextual de medo (Calzavara et al., 2008). Coerentemente com o papel fundamental da amígdala na resposta de medo condicionado (LeDoux, 2000), tem sido proposto que aferências dopaminérgicas em regiões corticais pré-frontais funcionariam como um gatilho na modulação exercida por essa área na amígdala (Marowsky et al., 2005; Royer et al., 1999). Além disso, o bloqueio do receptor dopaminérgico D1 na amígdala prejudica a evocação da resposta de medo condicionada (Nader & LeDoux, 1999). Embora a via nigroestriatal seja a mais atingida pela neurodegeneração na DP (Nieoullon, 2002), outras vias dopaminérgicas, incluindo as relacionadas com o processamento emocional, também parecem ser atingidas (Bowers et al., 2006; Vera-Cuesta et al., 2006). Dentro dessas alterações, devem-se ressaltar as alterações morfológicas significativas na amígdala encontradas em estudos *post mortem* de pacientes com DP (Braak et al., 1994; Harding et al., 2002; Bertrand et al., 2003).

Finalmente, conforme já mencionado, é importante considerar que a administração de reserpina, além de comprometer a transmissão dopaminérgica, também promove a depleção de serotonina e noradrenalina (Colpaert, 1987). Além disso, os modelos comportamentais aqui estudados supostamente avaliam diferentes tipos de memória (memória emocional, memória operacional e memória de reconhecimento), as quais parecem estar embasadas em diferentes sistemas neurais (Squire & Kandel, 2000). Nesse sentido, a depleção de monoaminas induzida pela

reserpina em diferentes regiões cerebrais em roedores apresenta efeitos de diferentes padrões temporais e intensidades (Penev et al., 1994; Yoshitake et al., 2004), fato que poderia explicar os diferentes efeitos da reserpina nos diversos modelos estudados. Especificamente no que diz respeito ao medo condicionado ao contexto, foi demonstrado que um aumento dos níveis de serotonina na amígdala basolateral promove uma redução da resposta de *freezing* (Inow et al., 2004). Paralelamente, o papel modulador da noradrenalina nesse comportamento foi bem estudado, mostrando que o bloqueio dessa neurotransmissão na amígdala diminui a resposta condicionada (Rooszendaal et al., 2006).

Podemos concluir que nossos dados corroboram estudos em modelos animais e trabalhos clínicos que mostram que déficits cognitivos podem preceder danos motores na DP. Os nossos resultados também indicam que uma baixa depleção monoaminérgica não afeta todos os tipos de memória, mas sim preferencialmente as que envolvem contextos emocionais. Não descartando um envolvimento da complexa interação de transmissões monoaminérgicas com a formação de tipos diferentes memória, poderíamos sugerir que o prejuízo de processamento emocional encontrado na DP pode estar relacionado com os déficits cognitivos apresentados por esses pacientes nos estágios iniciais da patologia.

6. Artigo submetido para publicação:

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

**Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: possible
relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease**

**Valéria S. Fernandes, Alessandra M. Ribeiro, Thieza G. Melo, Monique Godinho,
Flavio F. Barbosa, Danielle S. Medeiros, Hermany Munguba, Regina H. Silva***

Memory Studies Laboratory, Physiology Department, Federal University of Rio Grande
do Norte, Natal, Brazil

*Corresponding Author

Departamento de Fisiologia – Centro de Biociências - UFRN

Av. Salgado Filho, s/n - Caixa Postal 1511

CEP 59078-970 - Natal, RN, Brasil

Fax: 55-84-32119206

email: reginasilva@cb.ufrn.br

----- Forwarded Message -----

From: "Progress in NP & BP" <PNPBP@crchul.ulaval.ca>

To: reginasilva@cb.ufrn.br

Sent: 6 May 2008 05:14:45 +0100

Subject: Your Submission

Ms. Ref. No.: PNP-D-08-00120R2

Title: Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Dear Dr. Regina Helena Silva,

I am pleased to confirm that your paper "Memory impairment induced by low doses of reserpine in rats: possible relationship with emotional processing deficits in Parkinson disease" has been accepted for publication in Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

Guy Drolet

Editorial Office

Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry

Abstract

We have recently verified that the monoamine depleting drug reserpine – at doses that do not modify motor function - impairs memory in a rodent model of aversive discrimination. In this study, the effects of reserpine (0.1-0.5 mg/kg) on the performance of rats in object recognition, spatial working memory (spontaneous alternation) and emotional memory (contextual freezing conditioning) tasks were investigated. While object recognition and spontaneous alternation behavior were not affected by reserpine treatment, contextual fear conditioning was impaired. Together with previous studies, these results suggest that low doses of reserpine would preferentially induce deficits in tasks involved with emotional contexts. Possible relationships with cognitive and emotional processing deficits in Parkinson disease are discussed.

Keywords: reserpine, Parkinson Disease, memory, emotion, animal model

1. Introduction

The administration of reserpine to rodents has been suggested as a pharmacological model of Parkinson disease (PD) based on the effects of this monoamine-depleting agent on motor activity. Reserpine interferes with the storage of monoamines in intracellular vesicles, causing monoamine depletion in nerve terminals and transient hypolocomotion and muscular rigidity, depending on the dose (Colpaert 1987; Gerlach and Riederer, 1996). However, it is important to note that the use of reserpine treatment as a model of PD presents some limitations due to the fact that the drug does not induce nigrostriatal pathway degeneration.

Apart from the motor disturbance, other symptoms are presented by parkinsonian patients, including expressive cognitive deficits (Dubois et al., 1994; Shults, 2003; Lauterbach, 2004; Owen et al., 2004; Matsui et al., 2006). There is evidence that cognitive symptoms found in PD are related to executive dysfunction, in particular to working memory, but also planning and problem solving (Karel et al., 1996; Owen et al., 1998; Cox et al., 2002; Cools et al., 2002; Higginson et al., 2003; Lewis et al., 2003; 2005; Monchi et al., 2007; Nieoullon, 2002; Zgaljardic et al., 2004). Further, patients with Parkinson disease present alterations in stimulus response associations (Shohamy et al., 2005; Nagy et al., 2007), implicit learning (Schneider et al., 2003; Castner et al., 2007); feed-back based learning (Schmitt-Eliassen et al., 2007) reversal learning (Cools et al., 2007) and spatial memory (Pillon et al., 1996; 1997a,b; Giraudo et al., 1997). In this respect, studies suggest that the cognitive symptoms observed in patients with PD do not seem to be directly related to the motor deficits (Carvalho et al., 2006). The cognitive decrement does not respond to usual pharmacological treatment for PD, and

cognitive and motor symptoms may even be related to degenerative processes in different brain areas (Fenelon, 1997; Shults, 2003).

Recently, it has been shown that reserpine – at doses that do not modify motor function - impairs memory in a rodent model of aversive discrimination (Carvalho et al., 2006). Specifically, the doses used were 0.1, 0.25, 0.5 mg/kg and while all doses impaired memory, only the highest induced hypolocomotion. The fact that low doses of reserpine induced memory alterations but not motor impairment is in accordance with the observation that cognitive deficits precede severe motor disturbance both in Parkinson disease patients (Cooper et al., 1991; Owen et al., 1992) and in animal models of this disorder (Carvalho et al., 2006; Schneider and Pope-Coleman, 1995). Indeed, it has been proposed that low levels of disturbance of dopaminergic function would lead to cognitive impairment whereas high levels of dopamine depletion would lead to motor deficits that eventually would overlap preexisting cognitive symptoms (Owen et al., 1998; Schneider and Pope-Coleman, 1995; Pillon et al., 1997).

Although in the presence of motor impairments, other studies have investigated cognitive impairments on the performance of rodents or non-human primates in PD models (Alves et al., 2000; Milton et al., 2004; Perry et al., 2004; Skalisy et al., 2002). Most of these studies, specially the ones performed in rodents, used aversive conditioning tasks. For example, Alves et al (2000) observed memory deficits in reserpine-treated rats tested in the passive avoidance task. In addition, in another rodent model of PD, Perry et al. (2004) showed that intranigral 1-methyl-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration induced memory deficits in rats tested in the active avoidance task. Considering that several kinds of cognitive dysfunction (see above), as well as deficits in emotional processing (Bowers et al., 2006; Salgado-Pineda

et al., 2005; Schneider et al., 2003), can be observed in PD patients, the aim of the present study was to investigate the effects of low doses of reserpine on the performance of rats tested in behavioral models that evaluate different kinds of memory within different emotional contexts (novel object recognition, spatial working memory and contextual fear conditioning tasks).

2. Materials and methods

2.1. Animals and general procedures

Five-month old male Wistar rats were used. All animals were maintained in groups of four or five per cage, under a 12 h light/12 h dark cycle and at a constant temperature of $25 \pm 1^\circ\text{C}$, with food and water available ad libitum. Rats were handled in accordance with the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior guidelines for the use of animals in research. All efforts were made to minimize animal pain, suffering or discomfort, and to minimize the number of rats used.

Every rat was submitted to 20 minutes of gentle handling once a day for four days before the beginning of the experimental procedures. Different animals were used in each experiment. All behavioral sessions were recorded by a camera placed above the apparatus and tapes were watched afterwards for behavioral analysis, performed blinded to treatment.

In all experiments, animals were observed in a random order. Between trials and animals, the apparatus (and the objects in experiment I) were washed with a 5% ethanol solution.

2.2. Drug treatment

Reserpine (methyl reserpate 3,4,5-trimethoxycinnamic acid ester: Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) was dissolved in glacial acetic acid and diluted to the correct concentration in distilled water. Vehicle consisted of the same amount of acetic acid and water as in the reserpine solution. Both solutions had a pH = 7.0 and were given subcutaneously, at a volume of 1 ml/kg body weight, 24 h before each behavioral task.

The animals were randomly assigned to one of the following groups: injected with vehicle (VEH); injected with 0.1, 0.25 or 0.5 mg/kg reserpine (RES 0.1, RES 0.25 and RES 0.5, respectively).

The doses used in the present study were chosen in order to produce none or minimal motor impairment (Carvalho et al., 2006). The administration of the reserpine 24 h before the experiments (also used in the study of Carvalho et al., 2006), was used to ensure any motor effect that the drug could cause would not interfere with memory evaluation.

2.3. Procedures

2.3.1. *Experiment I: Novel object recognition task*

Rats (n= 6-7 per group) were individually placed in a box with no top (a rectangular floor (57X43 cm) with 33 cm high surrounding walls). The objects, different in both color and shape, similar in size, were positioned in each corner of the box and fixed on the floor so the rats could not move them. Pilot studies ensured that rats can discriminate the objects, and do not show preference for any of them. The objects were a plastic brush (12 X 4 X 3 cm), a plastic curve tube (10 cm in diameter, 12 cm long), a plastic curve tube (3 cm in diameter, 10 cm long), a plastic bowl (10.5 cm in diameter and 6.5 cm high), a plastic flower-shaped object (10 cm), and a plastic box (10.5 x 7 x 5 cm).

In the training session, 24 h after the injection, rats were exposed to the experimental chamber and four of the objects for 10 minutes. In the test session, 24 h after the training, two diagonally opposed objects were replaced for new objects and the rats were allowed to explore them for ten minutes. The time of exploration of each object was measured. Exploration behavior include touching, sniffing and biting each object.

2.3.2. *Experiment II: Spatial working memory task (spontaneous alternation)*

Twenty-four hours after injection, rats (n= 5-7 per group) were individually placed in a plus-maze, made of wood and with four enclosed arms (47 cm X 16 cm X 34 cm) extending from a central platform (16 cm X 16 cm). Thus, the animals could visit the arms via a central space. Rats were allowed to explore the apparatus for 10 minutes during which the number and sequence of arm entries were recorded. The individual arms were named A, B, C and D in clockwise manner. An alternation consisted of 4

different arm choices in 4 consecutive arms entries. An entry was scored when all four paws crossed into the arm. Percent alternation was calculated (number of alternations made / number of possible alternations).

2.3.3. Experiment III: Contextual fear conditioning

Because no significant effects were observed in memory in the other two experiments, only the two highest reserpine doses were used in this experiment. Contextual fear conditioning was accomplished in two consecutive days. The floor of the conditioning box (23 cm X 20 cm) was made of 25 stainless steel rods (15 mm diameter) through which footshock could be delivered from a current source. The box was enclosed in a sound attenuating chamber. In the training session, 24 hours after the injection, the rats (n= 6 per group) were individually placed into the box and after 150 s were given six moderate shocks (five seconds long 0.3 mA foot shocks with an interval of 30 s). Thirty seconds after termination of the procedure, rats were returned to their home cage.

In the test session, performed 24 h later, the animals were again placed in the chamber, without receiving foot shocks. The duration of freezing behavior (defined as the complete immobility of the animal) was registered during 5 minutes.

2.4. Data analysis

In experiments, the effect of reserpine on performance was analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. In experiment I, comparisons within groups for exploration of old x new objects were performed with paired-samples t-

test. Results are expressed as mean \pm SE and the significant threshold considered was $p = 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment I: Novel object recognition task

Rats treated with 0.1, 0.25 or 0.5 mg/kg reserpine (RES) or vehicle (VEH) spent similar time exploring the new objects. Indeed, no significant difference in percent time of new objects exploration was found in the test session ($F(3,27)=0.84$; $p= 0.49$; Figure 1A). Indeed, all groups presented increased exploration of new objects compared to old objects ($t=3.06$; 2.70; 2.67; 3.46 and $p=0.028$; 0.036; 0.044; 0.011 for VEH, RES 0.1, RES 0.25 and RES 0.5, respectively, figure 1B).

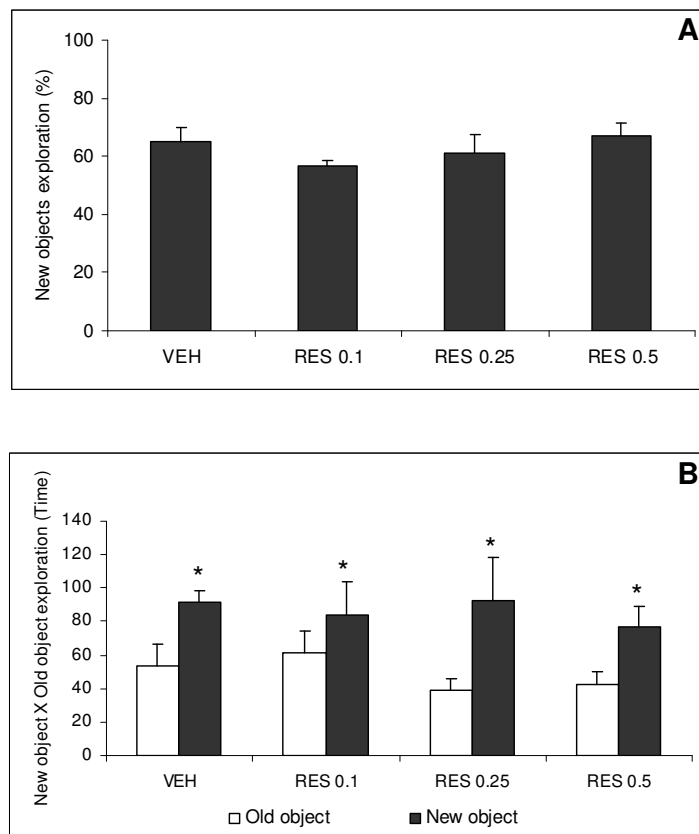


Figure 1. The effects of reserpine (RES 0.1, 0.25 or 0.5 mg/kg) or vehicle (VEH) on object recognition. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. Percent time spent in new objects exploration (A) and exploration of new objects compared to old objects (* $p < 0.05$ compared to old objects exploration; paired samples t-test) (B).

3.2. Experiment II: Spatial working memory task (spontaneous alternation)

No effects of reserpine administration were found on spontaneous alternation performances ($F(3,21)=0.50$; $p=0.68$; Figure 2A). However, as shown in Fig. 2B, rats that were treated with 0.5 mg/kg (but not 0.1 or 0.25 mg/kg) reserpine showed reduced total number of entries in the arms of the apparatus when compared to control group ($F(3,21)=5.31$; $p=0.007$).

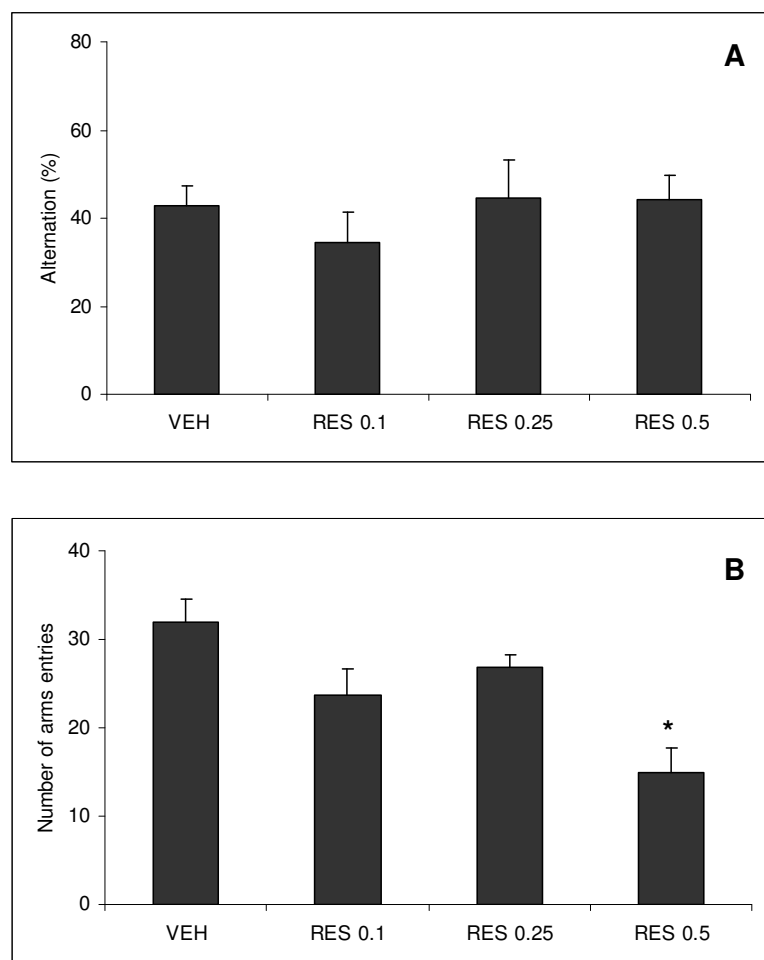


Figure 2. The effects of reserpine (RES 0.1, 0.25 or 0.5 mg/kg) or vehicle (VEH) on spontaneous alternation. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (A) Percent alternation. (B) Total number of entries in the arms of the plus-maze (ANOVA and Duncan's test - * $p < 0.05$ compared to vehicle).

3.3. Experiment III: Contextual fear conditioning

Figure 3 shows the effects of reserpine treatment on contextual conditioned freezing. During training, no significant difference was observed among the groups, indicating reserpine had no effect on sensitivity to the aversive stimulus (shock) ($F(2,15)= 0.21$; $p=0.82$) (Figure 3A). In test session, significant decreases in freezing duration were found for both RES groups when compared to the vehicle group ($F(2,15)=7.31$; $p= 0.006$)(Figure 3B).

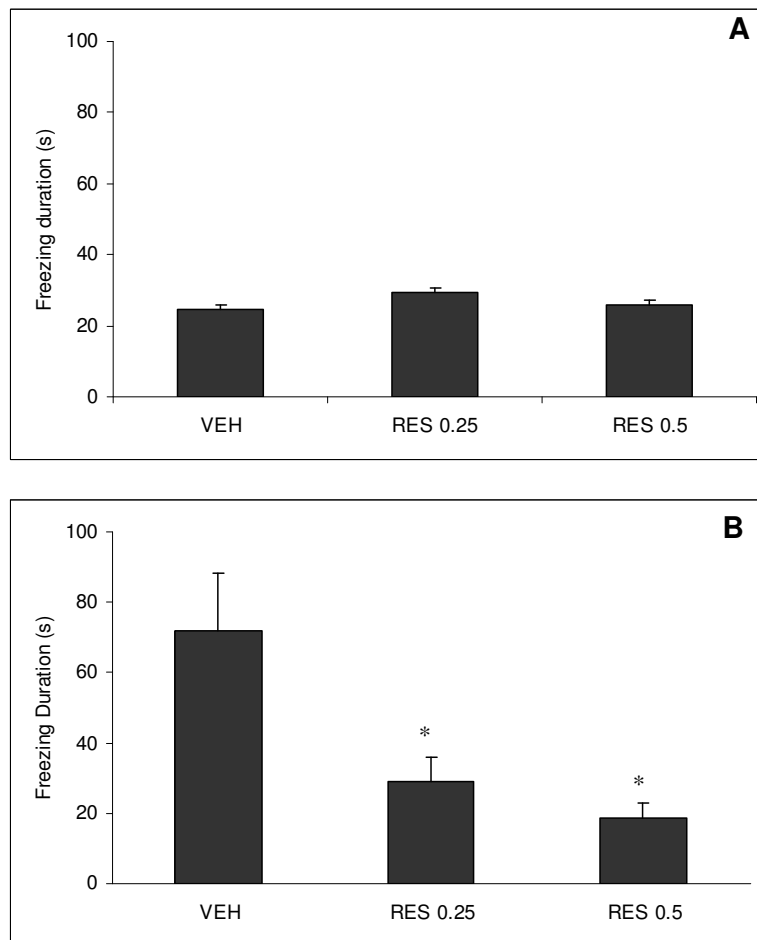


Figure 3. The effects of reserpine (RES 0.25 or 0.5 mg/kg) or vehicle (VEH) on contextual fear conditioning. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. (A) Training session. (B) Test session * $p < 0.05$ compared to vehicle (ANOVA and Duncan's test).

4. Discussion

The results of this study revealed that treatment with 0.1, 0.25 or 0.5 mg/kg reserpine did not modify novel object recognition or spontaneous alternation tasks. Conversely, rats treated with 0.25 or 0.5 mg/kg reserpine showed impaired contextual fear conditioning. Since only the highest dose of reserpine impaired motor function, the results of experiment III corroborate our previous study showing that reserpine treatment induced memory impairments in mice tested in the plus-maze discriminative avoidance task irrespective of motor alterations (Carvalho et al., 2006).

As mentioned before, the fact that lower doses of reserpine induced memory but not motor impairment is in accordance with the observation that cognitive deficits precede severe motor disturbance in Parkinson disease patients (Cooper et al., 1991; Marras et al., 2002). However, reserpine doses that induced discriminative avoidance (Carvalho et al., 2006) or fear conditioning (experiment III) impairments were not able to modify novel object recognition (experiment I) and spontaneous alternation (experiment II) performances.

The novel object recognition task is based on the fact that rats recognize a previously presented object, and therefore would spend more time exploring the new objects in the test session. The preference for exploring new objects was shown by all groups, irrespective of drug treatment (figure 1), indicating that reserpine did not affect this kind of memory. To our knowledge, this is the first study investigating novel object recognition after manipulations suggested as animal models of PD. However, the lack of alteration in this task is in accordance with some clinical studies showing intact recognition memory in PD patients (Gabrieli, 1996; Postle et al., 1997).

The spontaneous alternation task aims to evaluate working memory in rats. It is based on the fact that, when exposed to a new environment, rodents will efficiently explore the whole place, and hence will alternate among maze arms. The amount of alternation did not differ among the groups, showing once again absence of reserpine effects. Although this result corroborates the previously reported absence of reserpine effects on spontaneous alternation in rats (Kokkinidis & Anisman, 1976), working memory deficits seem to be a common symptom in PD (Dubois et al., 1994; Gabrieli, 1996; Kliegel et al., 2005; Vera-Cuesta et al., 2006). Indeed, it has been suggested that the cognitive impairments seen in the early stages of PD resemble that produced by frontal-lobe damage and include mainly deficits of executive functions such as planning and working memory (Lewis et al., 2003, Vera-Cuesta et al., 2006). In this respect, as mentioned before, reserpine treatment presents limitations as an animal model of PD. On the other hand, the administration of the selective neurotoxin 6-hydroxydopamine into the prefrontal cortex also failed to impair spontaneous alternation in rats (Bubser & Schmidt, 1990). A possible explanation to these conflicting results in clinical and animal studies would be the fact that working memory deficits in PD patients are positively correlated with motor impairment (Gabrieli, 1996; Vera-Cuesta et al., 2006), suggesting common mechanisms underlying the outcome of both factors. In the animal studies, the absence of important motor impairments could be related to the lack of working memory deficits. This issue remains to be investigated, although procedures that severely impair motor function would interfere with the evaluation of tasks based on exploratory activity.

The only memory deficit induced by reserpine administration reported here is an impaired contextual freezing conditioning (experiment III). This task is based on a classical conditioning procedure used to evaluate emotional memory. These results are

in agreement with previous studies showing impaired performance in aversive memory tasks following reserpine treatment (Alves et al., 2000; Silva et al., 2002; Naidu et al., 2004), although at higher doses. Additionally, they extend our previous finding reporting cognitive effects in the absence of motor impairments (Carvalho et al., 2006). The fact that the cognitive deficits induced by low doses of reserpine were observed only in aversive memory models (Carvalho et al., 2006 and experiment III) suggests an involvement of emotional processing mechanisms. In this respect, it is well known that emotional processing deficits are present in PD (Salgado-Pineda et al., 2005; Bowers et al., 2006; Schneider et al., 2003), which are probably related to the fact that parkinsonian patients fail to recall emotional material better than neutral information (Schneider et al., 2003), as expected for normal subjects (see Phelps, 2006).

It has been proposed that dopamine-mediated neurotransmission plays an essential role in emotional processing (see Salgado-Pineda et al., 2005). Accordingly, the dopamine D2 receptor antagonist haloperidol impairs the performance of rats in both discriminative avoidance (unpublished results) and contextual freezing conditioning (Calzavara et al., 2008). Consistent with the essential role of amygdala function in conditioned fear responses (LeDoux, 2000), a dopaminergic gating mechanism via which prefrontal cortical regions modulate amygdala has been proposed (Marowsky et al., 2005; Royer et al., 1999). In addition, D1 receptor blocking in the amygdala impairs the retrieval of conditioned fear response (Nader and LeDoux, 1999). Although the nigrostriatal pathway is the main target of neurodegeneration in PD (Nieoullon, 2002), other dopaminergic pathways, including those related to emotional processing, are also affected (Bowers et al., 2006; Vera-Cuesta et al., 2006). Of particular relevance, significant morphological alterations in the amygdala were found in post-mortem studies

of patients with idiopathic PD (Braak et al., 1994; Bertrand et al., 2003; Harding et al., 2002).

Aside from these considerations in the context of cognitive deficits in PD, it is important to consider that reserpine also induces noradrenaline and serotonin depletion (Colpaert, 1987). Moreover, the behavioral models used in the present study supposedly evaluate different kinds of memory (emotional memory, spatial working memory and recognition memory), which are founded in different neural systems. In this respect, the depletion of biogenic amines induced by reserpine in different regions of the rodent brain seems to have distinct time-course and magnitude (Penev et al., 1994; Yoshitake et al., 2004), which could explain the differences in reserpine effects on the several kinds of memory tasks. Specifically regarding conditioned freezing, it has been shown that increases in endogenous serotonin in the basolateral amygdala reduced the freezing response (Inow et al., 2004). It is important to mention that in that study the pharmacological manipulation was restricted to amygdala and serotonin transmission, which could explain the opposite results between that and the present study, in which a non-selective drug was administered systemically. Further, the modulatory role of noradrenergic pathways in this behavior has been well studied (Roosendaal et al., 2006). In summary, these neurotransmitters seem to exert a complex modulatory role on memory processes, depending on the site of action, neurotransmitter levels and task (Cools, 2006; Roosendaal et al., 2006; Shirahata et al., 2006).

In conclusion, our data corroborate animal and clinical studies showing that cognitive deficits precede motor impairment in PD. The results also indicate that low doses of reserpine would not affect all kinds of memory similarly, but would preferentially induce deficits in tasks involved with emotional contexts.

5. Acknowledgments

The authors would like to thank Breno Tércio Carneiro for methodological assistance and Drs. John F. Araujo and Vanessa C. Abílio for helpful suggestions. This research was supported by fellowships from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ (Proc 305029/2004-5; 472625/2006-3 and 152573/2007-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.

6. References

- Alves, CSD; Andreatini, R; da Cunha, C; Tufik, S; Vital, MABF. Phosphatidylserine reserves reserpine-induced amnesia. *European Journal of Pharmacology*, 2000; 404: 161-167.
- Braak, H; Braak, E; Yilmazer, D; de Vos, RA; Jansen, EN; Bohl, J; Jellinger, K; Amygdala pathology in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol*, 1994; 88: 493-500.
- Bertrand, E; Lechowicz, W; Lewandowska, E; Szpak, GM; Dymecki, J; Kosno-Kruszewska, E; Wierzba-Bobrowicz, T. Degenerative axonal changes in the hippocampus and amygdala in Parkinson's disease. *Folia Neuropathol*, 2003; 41: 197-207.
- Bowers, D; Miller, K; Mikos, A; Kirsch-Darrow, L; Springer, U; Fernandez, H; Foote, K; Okun, M. Starling facts about emotion in Parkinson's disease: blunted reactivity to aversive stimuli. *Brain*, 2006; 129: 3356-3365.
- Bubser, M; Schmidt, WJ. 6-Hydroxydopamine lesion of the rat prefrontal cortex increases locomotor activity, impairs acquisition of delayed alternation tasks, but

- does not affect uninterrupted tasks in the radial maze. *Behav Brain Res*, 1990; 37: 157-168.
- Calzavara, MB; Medrano, WA; Levin, R; Kameda, SR; Andersen, ML; Tufik, S; Silva, RH; Frussa-Filho, R; Abílio, VC. Neuroleptic drugs revert the contextual fear conditioning deficit presented by spontaneously hypertensive rats: A potential animal model of emotional context processing in schizophrenia? *Schizophr Bull*, 2008; 16: 1-12.
- Carvalho, RC; Patti, CC; Takatsu-Coleman, AL; Kameda, SR; Souza, CF; Garcez-do-Carmo, L, Abílio, VC, Frussa-Filho, R; Silva, RH. Effects of reserpina on the plus-maze discriminative avoidance task: Dissociation between memory and motor impairments. *Brain Research*, 2006; 1122: 176-183.
- Castner, JE; Chenery, HJ; Colpland, DA; Coyner, TJ; Sinclair, F; Silburn, PA. Semantic and affective priming as a function of stimulation of the subthalamic nucleus in Parkinson`s disease. *Brain*, 2007; 130: 1395-1407.
- Colpaert, FC. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology*, 1987; 26: 1431-1440.
- Cools, R; Stefanova, E; Barker, RA; Robbins, TW; Owen, AM. Dopaminergic modulation of high-level cognition in Parkinson's disease: the role of the prefrontal cortex revealed by PET. *Brain*, 2002; 125: 584-594.
- Cools, R. Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-Dopa treatment in Parkinson's disease. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 2006; 30: 1-23.

- Cools, R; Lewis, SJG; Clark, L; Barker, RA; Robbins, TW. L-Dopa disrupts activity in the Nucleus Accumbens during reversal learning in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, 2007; 32: 180-189.
- Cooper, J; Sagar, HJ; Jordan, N; Harvey, NS; Sullivan, EV. Cognitive impairment in early, untreated Parkinson's disease and its relationship to motor disability. *Clin Neuropsychol*, 1991; 14: 38-55.
- Cox, SML; Stefanova, E; Johnsrude, IS; Robbins, TW; Owen, AM. Preference formation and working memory in Parkinson's disease and normal ageing. *Neuropsychologia*, 2002, 40: 317-326.
- Dubois, B; Malapani, C; Verin, M; Rogelet, P; Deweer, B; Pillon, B. Cognitive function and the basal ganglia: the model of Parkinson disease. *Rev Neurol*, 1994; 150: 763-770.
- Fénelon, G. Parkinson disease. Medical treatment. *Presse Med*, 1997; 26: 1357-61.
- Gabrieli, JDE. Memory systems analyses of mnemonic disorders in aging and age-related diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996; 93: 13534-13540.
- Gerlach, M; Riederer, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. *J Neural Transm*, 1996;103: 987-1041.
- Giraud, MD; Gayraud, D; Habib, M. Visuospatial ability of Parkinsonians and elderly adults in location memory tasks. *Brain and Cognition*, 1997; 34: 259-273.
- Harding, AJ; Stimson, E; Henderson, JM; Halliday, GM. Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease. *Brain*, 2002; 125: 2431-45.

- Higginson, CI; King, DS; Levine, D; Wheelock, VL; Khamphay, NO; Sigvardt, KA. The relationship between executive function and verbal memory in Parkinson's disease. *Brain and Cognition*, 2003; 52: 343-352.
- Inow, T; Li, XB; Abekawa, T; Kitaichi, Y; Izumi, T; Nakagawa, S; Koyama, T. Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. *European Journal of Pharmacology*, 2004; 497: 311-316.
- Karel, PMVS; Berger, HJC; Horstink, MWIM; Buytenhuijs, EL; Cools AR. Executive functions and disease characteristics in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 1996; 34: 617-626.
- Kliegel, M; Phillips, LH; Lemke, U; Kopp, UA. Planning and realisation of complex intentions in patients with Parkinson's disease. *J Neuro Neurosurg Psychiatry*, 2005; 76: 1501-1505.
- Kokkinidis, L; Anisman, H. Interaction between cholinergic and catecholaminergic agents in a spontaneous alternation task. *Psychopharmacology*, 1976; 48: 261-270.
- LeDoux, JE. Emotion circuits in the brain. *Annu Rev Neurosci*, 2000; 23: 155-184.
- Lauterbach, EC. The neuropsychiatry of Parkinson's disease and related disorders. *Psychiatr Clin North Am*, 2004; 27: 801-25.
- Lewis, S; Dove, A; Robbins, TW; Barker, RA; Owen, AM. Cognitive impairments in early Parkinson's disease are accompanied by reductions in activity in frontostriatal neural circuitry. *The Journal of Neuroscience*, 2003; 23: 6351-6356.
- Lewis, SJG; Slabosz, A; Robbins, TW; Barker, RA; Owen, AM. Dopaminergic basis for deficits in working memory but not attentional set-shifting in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 2005, 43: 823-832.

- Marowsky, A; Yanagawa, Y; Obata, K; Vogt, KE. A specialized subclass of interneurons mediates dopaminergic facilitation of amygdala function. *Neuron*, 2005; 48: 877-9.
- Marras, C; Rochon, P; Lang, AE. Predicting motor decline and disability in Parkinson Disease. *Arch Neurol*, 2002, 59: 1724-1728.
- Matsui, H; Udaka, F; Mivoshi, T; Hara, N; Tamura, A; Oda, M; Kubori, T; Nishinaka, K; Kameyama, M. Frontal assessment battery and brain perfusion image in Parkinson's Disease. *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology*, 2006, 19: 41-46.
- Milton, AL; Marshall, JWB; Cummings, RM; Baker, HF; Ridley, RM. Dissociation of hemi-spatial and hemi-motor impairments in a unilateral primate model of Parkinson's disease. *Behavioral Brain Research*, 2004; 150: 55-63.
- Monchi, O; Petrides, M; Mejia-Constain, B; and Strafella, A P. Cortical activity in Parkinson's disease during executive processing depends on striatal involvement. *Brain*, 2007; 130: 233-244.
- Nader, K; LeDoux, J. Inhibition of the mesoamygdala dopaminergic pathway impairs the retrieval of conditioned fear associations. *Behavioral Neuroscience*, 1999; 133: 891-901.
- Nagy, H; Kéri, S; Myers, CE; Benedek, G; Shohamy, D; Gluck, MA. Cognitive sequence learning in Parkinson's disease and amnesic mild cognitive impairment: Dissociation between sequential and non-sequential learning of associations. *Neuropsychologia*, 2007; 45: 1386-1392.
- Naidu, PS; Singh, A; Kulkarni, SK. Reversal of reserpine-induce orofacial dyskinesia and cognitive dysfunction by quercetin. *Pharmacology*, 2004; 70: 59-67.

- Nieoullon, A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. *Progress in Neurobiology*, 2002; 67: 53-83.
- Owen, AM; James, M; Leigh, PN; Summers, BA; Marsden, CD; Quinn, NP; Lange, KW; Robbins, TW. Fronto-striatal cognitive deficits at different stages of Parkinson's disease. *Brain*, 1992; 6: 1727-51.
- Owen, AM; Doyon, J; Dagher, A; Sadikot A; Evans, AC. Abnormal basal ganglia outflow in Parkinson's disease identified with PET: Implications for higher cortical functions. *Brain*, 1998; 121: 949–965.
- Owen, AM. Cognitive dysfunction in Parkinson's Disease: The role of Frontostriatal Circuitry. *The Neuroscientist*, 2004; 10: 525-537.
- Penev, PD; Zee, PC; Turek, FW. Monoamine depletion blocks triazolam-induced phase advances of the circadian clock in hamsters. *Brain Res*, 1994; 637: 255-61.
- Perry, JC; Da Cunha, C; Anselmo-Franci, J; Andreatini, R; Miyoshi, E; Tufik, S; Vital, MA. Behavioural and neurochemical effects of phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra of rats. *Eur J Pharmacol*, 2004; 484: 225-33.
- Phelps, EA. Emotion and cognition: insights from studies of the human amygdale. *Annu Rev Psychol*, 2006; 57: 27-53.
- Pillon, B; Ertle, S; Deweer, B; Sarazin, M; Agid, Y; Dubois, B. Memory for spatial location is affected in Parkinson's disease. *Neuropsychologia*, 1996; 34: 77-85.
- Pillon, B; Deweer, B; Vidailhet, M; Bonnet, AM; Hahn-Barma, V; Dobois, B. Is impaired memory for spatial location in Parkinson's disease domain specific or dependent on 'strategic' processes? *Neuropsychologia*, 1997; 36: 1-9.

Pillon, B; Ertle, S; Deweer, B; Bonnet, AM; Vidailhet, M; Dubois, B. Memory for spatial location in “de novo” parkinsonian patients. *Neurochologia*, 1997a; 35 221-228.

Postle, BR; Locascio, JJ; Corkin, S; Growdon, JH. The time course of spatial and object learning in Parkinson’s disease. *Neuropsychologia*, 1997; 35: 1413-1422.

Roosendaal, B; Okuda, S; de Quervain, DJ; McGaugh, JL. Glucocorticoids interact with emotion-induced noradrenergic activation in influencing different memory functions. *Neuroscience*, 2006; 138: 901-10.

Royer, S; Martina, M; Pare, D. An inhibitory interface gates impulse traffic between the input and output stations of the amygdala. *J Neurosci*, 1999; 19:10575-83.

Salgado-Pineda, P; Delaveau, P; Blin, O; Nieoullon, A. Dopaminergic contribution to the regulation of emotion perception. *Clin Neuropharmacol*, 2005; 28: 228-237.

Scherfler, C; Khan, NI; Pavese, N; Eunson, L; Graham, E; Lees, A J; Quinn, NP; Wood, NW; Brooks, DJ; Piccini, PP. Striatal and cortical pré- and postsynaptic dopaminergic dysfunction in sporadic parkin-linked parkinsonism. *Brain*, 2004; 127: 1332-1342.

Shirahata, T; Tsunoda, M; Santa, T; Kirino, Y; Watanabe, S. Depletion of serotonin selectively impairs short-term memory without affecting long-term memory in odor learning in the terrestrial slug *Limax valentianus*. *Learn Mem*, 2006; 13: 267-70.

Schneider, JS; Pope-Coleman, A. Cognitive deficits precede motor deficits in a slowly progressing model of parkinsonism in the monkey. *Neurodegeneration*, 1995; 4: 245-255.

Schneider, K; Habel, U; Volkmann, J; Regel, S; Kornischka, J; Sturm, V; Freund, HJ.

Deep brain stimulation of the subthalamic nucleus enhances emotional processing in parkinson disease. *Arch Gen Psychiatry*, 2003; 60: 296-302.

Schmitt-Eliassen, J; Ferstl, R; Wiesner, C; Deuschl, G; Witt, K. Feedback-based versus observational classification learning in healthy aging and Parkinson's disease. *Brain Research*, 2007; 1142: 178-188.

Shohamy, D; Myers, CE; Grossman, S; Sage, J; Gluck, MA. The role of dopamine in cognitive sequence learning: evidence from Parkinson's disease. *Behavioural Brain Research*, 2005; 159: 191-199.

Shults, CW. Treatments of Parkinson Disease. *Arch Neurol*, 2003; 60: 1680:1684.

Silva, RH; Abílio, VC; Torres-Leite, D; Bergamo, M; Chinen, CC; Claro, FT; Carvalho, RC; Frussa-Filho, R. Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. *Behavioural Brain Research*, 2002; 132: 171-177.

Skalisy, LL; Beijamini, V; Joca, SL; Vital, MABF; da Cunha, C; Andreatini, R. Evaluation of the face validity of reserpine administration as an animal modelo of depression-Parkinson's disease association. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 2002; 26: 879-883.

Vera-Cuesta, H; Vera-Acosta, H; Alvarez-González, L; Fernández-Maderos, I; Casabona-Fernández, E. Frontal dysfunction in idiopathic Parkinson's disease. *Ver Neurol*, 2006; 42: 76-84.

Yoshitake, T; Yoshitake, S; Fujino, K; Nohta, H; Yamaguchi, M; Kehr, J. High-sensitive liquid chromatographic method for determination of neuronal release of serotonin,

noradrenaline and dopamine monitored by microdialysis in the rat prefrontal cortex.

J Neurosci Methods, 2004; 140: 163-8.

Zgaljardic, DJ; Foldi, NS; Borod, JC. Cognitive and behavioral dysfunction in Parkinson's disease: neurochemical and clinicopathological contributions. J. Neural Transm, 2004; 111: 1287-1301.

7. Referências adicionais

- Crofts, HS; Dalley, JW; Collins, P; Van Denderen, JC; Everitt, BJ; Robbins, TW; Roberts, AC.** 2001. Differential effects of 6-OHDA lesions of the frontal cortex and caudate nucleus on the ability to acquire an attentional set. *Cereb Cortex*, **11**, 1015-26.
- Delfino, M A; Stefano, A V; Ferrario, J E; Tavavini, I R E; Murer, M G; Gershanik, O S.** 2004. Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. *Behavioural Brain Research*, **152**, 297-306.
- Johnston, R E; Schallert, T; Becker, J B.** 1999. Akinesia and postural abnormality after unilateral dopamine depletion. *Behavioural Brain Research*, **104**, 189-196.
- Kim, H; Gyu-Seek, R; Oh, S; Park, W.** 1999. NMDA receptor antagonists inhibit apomorphine-induced climbing behavior not only in intact mice but also in reserpine-treated mice. *Behavioural Brain Research*, **100**, 135-142.
- Koerts, J; Leenders, K L; Koning, M; Portman, A T; van Beilen, M.** 2007. Striatal dopaminergic activity (FDOPA-PET) associated with cognitive items of a depression scale (MADRS) in Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, **25**, 3132-3136.
- Korczyn, A D.** 2001. Dementia in Parkinson's disease. *J. Neurol*, **248** (suppl3), III/1-III/4.
- Lindner, M D; Cain, C K; Plone, M A; Frydel, B R; Blaney, T J; Emerich, D F; Hoane, M R.** 1999. Incomplete nigrostriatal dopaminergic cell loss and partial

reductions in striatal dopamine produce akinesia, rigidity, tremor and cognitive deficits in middle-aged rats. *Behavioural Brain Research*, **102**, 1-16.

Liu, Y; Peter, D; Merickel, A; Krantz, D; Finn, J P; Edwards, R H. 1996. A molecular analysis of vesicular amine transport. *Behavioural Brain Research*, **73**, 51-58.

Mayeux, R. Epidemiology neurodegeneration. *Annu. Rev. Neurosci*, 2003; **62**, 81-104.

Parkinson, J. 2002. An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, **14**, 223-236.

Rang, H P, Dale, M M, Ritter, J M, Moore, P K. 2004. Farmacologia. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 5 ed., 903p.

Ridley, R M; Cummings, R M; Leow-Dyke, A; Baker, H F. 2006. Neglect of memory after dopaminergic lesions in monkeys. *Behavioural Brain Research*, **166**, 253-262.

Squire LR, Kandel ER. 2000. Memory: from mind to molecules. New York: *W.H. Freeman and Company*.

Veheij, M M M; Cools, A R. 2007. Differential contribution of storage pools to the extracellular amount of accumbal dopamine in high and low responders to novelty: effects of reserpine. *Journal of Neurochemistry*, **100**, 810-821.