Maria Carolina Lobo de Almeida Garrett

DOENÇA DE HUNTINGTON

- CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO -

Porto - 1992

Maria Carolina Lobo de Almeida Garrett

DOENÇA DE HUNTINGTON

- CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO-

Porto - 1992

II

Maria Carolina Lobo de Almeida Garrett

DOENÇA DE HUNTINGTON

- CONTRIBUIÇÃO PARA O SEU ESTUDO -

Dissertação de candidatura ao grau de doutor, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Medicina do Porto e subsidiado pelo Instituto Nacional de Investigação Cíentifica.

Porto - 1992

Artigo 48°, parágrafo 3 - A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto - Decreto nº 19337, de 29 de Janeiro de 1931)

A meus Pais

A meus Irmãos

Á memória

de

Doutor Carlos Alberto da Silva

Professor Doutor Manuel Sobrinho Simões

Aos Professores

Celso Cruz

António Saraiva

Walter Osswald

Ao

Patrício Soares da Silva

CORPO CATEDRÁTICO
DA FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO

Doutor Alexandre Alberto Guerra de Sousa Pinto
Doutor Amândio Gomes Sampaio Tavares
Doutor António Alberto Falcão de Freitas
Doutor António Augusto Lopes Vaz
Doutor António Carvalho de Almeida Coimbra
Doutor António Fernandes de Oliveira Barbosa Ribeiro Braga
Doutor António Germano Pina da Silva Leal
Doutor António Luis Tomé da Roca Ribeiro
Doutor António Manuel Sampaio de Araújo Teixeira
Doutor Cândido Alves Hipólito Reis
Doutor Carlos Rodrigo de Magalhães Ramalhão
Doutor Celso Renato Paiva Rodriges da Cruz
Doutor Daniel dos Santos Pinto Serrão
Doutor Eduardo Jorge da Cunha Rodrigues Pereira
Doutor Francisco José Zarco Carneiro Chaves
Doutor João da Silva carvalho
Doutor Joaquim Germano Pinto Machado Correia da Silva
Doutor Joaquim de Oliveira Costa Maia
Doutor Jorge Manuel Mergulhão Castro Tavares
Doutor Joaquim Augusto Fleming Torrinha
Doutor José Carvalho de Oliveira
Doutor José Fernando de Barros Castro Correia
Doutor José Manuel Costa Mesquita Guimarães
Doutor José Manuel Gonçalves Pina Cabral
Doutor José Pinto de Barros
Doutor José Vaz Saleiro e Silva
Doutor Henrique José Ferreira Lecour de Menezes
Doutor Levy Eugénio Ribeiro Guerra
Doutor Luis António Mota Prego Cunha Soares de Moura Pereira Leite
Doutor Manuel Alberto Coimbra Sobrinho Simões
Doutor Manuel Augusto Cardoso de Oliveira
Doutor Manuel Machado Rodrigues Gomes
Doutor Manuel Maria Paula Barbosa
Doutor Manuel Miranda Magalhães
Doutor Manuel Teixeira Amarante Junior
Doutora Maria da Conceição Fernandes Marques Magalhães
Doutora Maria Isabel Amorim de Azevedo
Doutor Mário José Cerqueira Gomes Braga

Doutor Norberto Teixeira dos Santos
Doutor Serafim Correia Pinto Guimarães
Doutor Valdemar Miguel Botelho Santos Cardoso
Doutor Victor Manuel Oliveira Nogueira Faria
Doutor Walter Friedrich Alfred Osswald

Professores Jubilados

Doutor Abel José Sampaio da Costa Tavares
Doutor Albano dos Santos Pereira Ramos
Doutor António Fernandes da Fonseca
Doutor Artur Manuel Giesteira de Almeida
Doutor Carlos Sampaio Pinto de Lima
Doutor Casimiro Águeda de Azevedo
Doutor João Costa
Doutor Fernando de Carvalho Cerqueira Magro Gomes Ferreira
Doutor Franscisco de Sousa Lé
Doutor Joaquim José Monteiro Bastos
Doutor José Ruiz de Almeida Garrett
Doutor Júlio Machado de Sousa Vaz
Doutor Manuel José Bragança Tender

Professores Honorários

Doutor Maurice Mercadier
Doutor Ullrich Georg Tredelenburg
Doutor Victor António Augusto Nunes de Sá Machado

As Ciências Neurológicas são um bom exemplo da necessidade da complementação harmónica entre o conhecimento básico e clínico para a compreensão de como funciona o sistema nervoso em condições normais ou patológicas. Na curta história do Serviço onde trabalho, os exemplos das dissertações de doutoramento do Professor Celso Cruz, Doutor António Saraiva e Doutor Carlos Alberto da Silva são exemplo vivo do que acabo de dizer.

Os gânglios da base constituíram durante muito tempo uma zona cinzenta dentro das ciências neurológicas. Nas últimas décadas observou-se um enorme incremento na compreensão da fisiologia e patofisiologia destas estruturas sub-corticais. Embora longe de compreendermos bem o seu modo de funcionamento, importantes passos têm sido dados nas últimas décadas. Estes avanços dependeram de estudos em diversas áreas, como por exemplo a morfologia, a fisiologia, a farmacologia, a bioquímica, a electrofisiologia e a genética. Estas doenças constituem bem um exemplo do interesse da aliança das disciplinas clínicas e básicas.

Durante o meu internato de Neurologia tive a oportunidade de estudar doentes afectados de doença de Huntington. No contacto que tive com estes chocou-me a incapacidade de poder minorar de alguma forma o seu sofrimento e de suas famílias, por ausência de tratamento (causal e sintomático) e pela ineficácia das poucas estruturas sociais de auxílio existentes. Talvez pelos motivos referidos no parágrafo anterior interessei-me de uma forma particular pelo estudo desta doença. Sem dúvida, das diversas terapêuticas preconizadas na literatura, apenas os neurolépticos e os antidepressivos tinham nos meus doentes alguma, se bem que modesta, acção terapêutica. Em relação aos neurolépticos, os doentes referiam, quase sempre, alívio da coreia, embora esta melhoria nos parecesse, por vezes, mais subjectiva do que objectiva. À primeira vista este facto sugeria que a eficácia terapêutica deste grupo de fármacos dependia de uma possível hiperactividade dopaminérgica cerebral. Porém, na literatura as referências a este respeito eram confusas e as conclusões retiradas dos resultados contraditórias. Esta contradição sempre me intrigou e a minha relação preveligiada com o Departamento de Farmacologia da

Faculdade de Medicina do Porto possibilitou-me a tentativa do seu esclarecimento. O Doutor Patrício Soares da Silva, investigador com um curriculum excepcionalmente rico no estudo dos mecanismos dopaminérgicos e com um conhecimento profundo da técnica de cromatografia líquida de alta pressão com detecção electroquímica, tornou possível a realização desta investigação que constitui a base principal da minha dissertação de doutoramento. A ele quero expressar o meu reconhecido agradecimento pela sua disponibilidade, pelos seus ensinamentos e pela sua amizade.

Ao abrigo do Decreto-Lei nº 388/70 (Art.8º, #2) os resultados apresentados nos capítulos 1 e 2 fazem parte das seguintes publicações:

A kinetic study of the rate of formation of dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA) in the brain of the rat: implications for the origin of DOPAC. P. Soares-da-Silva and M.C.Garrett (1990) Neuropharmacology, 29, 869-874.

Role type A and B monoamine oxidase on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) in tissue from the brain of the rat. M.C. Garrett and P. Soares-da-Silva. (1990) Neuropharmacology, 29, 869-874.

Overflow of endogenous dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid from tissues of the rat brain, elicited by electrical stimulation, depolarization by potassium and activation of carrier-mediated release. P. Soares-da-Silva and M.C.Garrett (1990) Neuropharmacology, 29, 1151-1159.

A study on the effects of tryptophan hydroxylase and type A monoamine oxidase inhibition of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA) levels in the brain of the rat: implication for the origin of 5-HIAA. P. Soares-da-Silva and M.C. Garrett (1991) Molecular Neuropharmacology, 1, 83-90.

Increased cerebrospinal fluid dopamine and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid levels in Huntington's Disease: Evidence for an overactive dopaminergic brain transmission . M..C. Garrett and P. Soares-da-Silva(1992) Journal of Neurochemistry, 58, 101-106

Neste trabalho não se pretendeu fazer uma revisão da doença de Huntington, pretendeu-se sim esclarecer um aspecto controverso desta doença através dos estudo clínico e laboratorial dos doentes, aliado a

estudos experimentais com o objectivo de clarificar os resultados obtidos no estudo clínico.

Ao Senhor Professor Doutor Celso Cruz agradeço toda a confiança em mim depositada, a abertura com que sempre me ouviu, as oportunas sugestões que sempre me soube dar e a amizade com que sempre me honrou.

Não pode deixar de ser exaltada neste momento, a memória do Senhor Doutor Carlos Alberto da Silva pelo seu exemplo de investigador e de Homem.

É também minha grata obrigação agradecer:

-ao Senhor Doutor António Saraiva a quem devo muita da minha formação neurológica e muita compreensão e amizade;

-ao Senhor Professor Doutor Walter Osswald por ter permitido a colaboração do Departamento que dirije e pelo encorajamento amigo na realização deste trabalho;

-a meus Pais por toda a ajuda que me dispensaram;

-ao Senhor Drº Rolando Barbosa pela a amizade que sempre me dispensou e, muito particularmente, por me ter proporcionado condições de disponibilidade para a realização deste trabalho;

-ao pessoal técnico do Laboratório de Farmacologia pelo auxílio que me prestaram. Quero, muito particularmente, destacar a Manuela Moura e a Prazeres Cleto pelo auxílio no trabalho experimental e preparação do LCR e aos Srºs Aldovino Sousa e Abílio Nunes na preparação dos animais de experiência.

-aos meus colegas e pessoal de enfermagem do Departamento de Neuroradiologia pela sua colaboração na recolha do LCR em doentes que constituiram o grupo testemunha;

-à D. Maria José e à D. Fernanda pela ajuda que me prestaram na recolha de bibliografia;

-a todos os meus colegas e ao pessoal de enfermagem que no serviço de uma forma ou de outra me ajudaram.

SUMÁRIO

I - Introdução geral

II - Capítulo 1 - Parte experimental

Introducão

Material e métodos

1ª série experimental - Estudo do efluxo da dopamina e do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no tecido cerebral de Rato, induzido por estimulação eléctrica, despolarização pelo potássio e activação da libertação dependente de um transportador transmembranoso.

2ª série experimental - Estudo cinético da formação de dopamina, ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) no cérebro de Rato: implicações para a origem do DOPAC.

3ª série experimental - Papel da monaminoxídase (MAO) de tipo A e B na formação do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no tecido cerebral de Rato.

4ª série experimental - Efeito da inibição da hidroxílase do triptofano e da monoaminoxídase de tipo A sobre os níveis da 5-hidroxitriptamina e do ácido 5-hidroxiindolacético(5-HIAA) no cérebro de Rato: implicações sobre a origem do 5-HIAA

Resumo e conclusões finais

III- Capítulo 2 - Parte Clínica

IV - Discussão Geral e Conclusões Gerais

V - Resumo, Summary, Resumé

VI - Apêndice

Resumos das història clínicas
Escala de Incapacidade Funciona
"Mini Mental State Examination"
Exame Neurológico Quantitativo

VII- Bibliografia

I - Introdução Geral

"The hereditary chorea, as I shall call it, is confined to certain and fortunately a few families, and has been transmitted to them, an heirloom from generations away back in the dim past. It is spoken of by those in whose veins the seeds of the disease are known to exist, with a kind of horror, and not at all alluded to except through dire necessity when it is mentionated as "that disorder". It is attended generally by all the symptoms of common chorea, only in an aggravated degree, hardly ever manifestating itself until the adult or middle life, and then coming on gradualy but surely, increasing by degree, and often occupying years in its developement, until the hapless sufferer is but a quivering wreck of his former self...There are three marked peculiarities in this disease: 1, its hereditary nature; 2, a tendency to insanity and suicide; 3, its manifestating itself as a grave disease only in the adult life"[110]

A doença de Huntington é uma afecção do sistema nervoso central (SNC), de transmissão autossómica dominante, que se manifesta essencialmente na idade adulta por deterioração progressiva das funções motora e cognitiva[147]. Descrições que lhe poderão corresponder datam da segunda metade do século XIX. Watters em 1841, Wood em 1855, Lund em 1860 e Lyon em 1863 **(citados por: DeJong, 1973; Martin, 1984[71,147])** descreveram formas de "coreias hereditárias" que se adequam perfeitamente a esta enfermidade. Contudo, é com a comunicação de George Huntington à "Meigs and Mason Academy of Medecine" em 1872, baseada nas suas observações e nas de seu pai e seu avô, que pela primeira vez se chama a atenção para esta doença[110]. A designação com que actualmente é conhecida constitui, pois, uma merecida homenagem ao poder de observação deste médico.

Desde as primeiras descrições foi possível determinar, através do estudo das diversas famílias afectadas, que a doença era proveniente de uma alteração genética com origem comum, muito provavelmente sediada no continente europeu; verificou-se também que não tinham ocorrido novas mutações[147] ou que, pelo menos, a incidência destas era muito reduzida[55]. Na década de 70, o avanço da biologia molecular tornou possível a identificação de um marcador de ADN ligado ao gene da doença de Huntington. Este facto permitiu iniciar estudos de diagnóstico pré-sintomático[95].

Esta doença constitui uma situação patológica rara. Entre os caucasianos tem uma incidência anual de 3 a 4 casos por milhão de habitantes e uma prevalência de 30 a 70 casos também por milhão. Nos negróides (Estados Unidos América e África do Sul) e na raça amarela (Japão) a sua prevalência é significativamente mais baixa[39,37,213].

A sua apresentação clínica mais comum é a forma coreica, que corresponde à descrita por Huntington. Inicia-se entre os 21-50 anos, caracterizando-se por demenciação acompanhada, como alteração motora mais notória, pela coreia. Perturbações emocionais mais ou menos graves são frequentes e, em muitos casos, antecedem em anos o aparecimento da demência e da coreia. Outra forma, menos habitual, é a acinético-rígida, na qual a alteração motora principal se traduz por acinésia e rigidez e por uma evolução mais rápida dos sintomas. É mais frequente em idades jovens (abaixo dos 20 anos), podendo mesmo surgir durante a infância (2% dos casos) [39,168]. A forma acinético-rígida de início precoce tem nítida predominância de transmissão paterna, enquanto que a forma coreica

de início tardio (acima dos 50 anos) tem uma transmissão habitualmente materna[168,266].

Coreia e Corpo Estriado

A evolução do conceito de "doenças de sistema" passou evidentemente por várias fases, dependendo das técnicas de análise disponíveis. A primeira foi naturalmente a morfológica.

Embora as primeiras referências relacionando a coreia com o estriado possam descobrir-se já em 1871, nas observações de Meynert, o primeiro estudo em que esta relação é indubitavelmente reconhecida data de 1911 e é da autoria de Alzheimer[74]. Porém, foi demonstrado por estudos posteriores que a doença de Huntington não atinge somente o estriado mas também outras áreas do SNC[74]. Sob o ponto de vista neuropatológico observa-se uma perda neuronial, que sendo mais notável e precoce no estriado, atinge também o pálido e o córtex frontal e occipital. Têm sido descritas alterações idênticas no tálamo, sub-tálamo, hipotálamo e tronco cerebral [37,206].

Estudos morfométricos realizados nesta doença revelaram uma perda de 30% do peso total do cérebro. Observa-se uma atrofia de cerca de 60% no caudado-putámen e de 20 a 30% no córtex cerebral, substância branca subcortical e tálamo[68]. No estriado, a atrofia é mais marcada na porção dorsal, permanecendo a ventral (na qual o *nucleus accumbens* se localiza) relativamente preservada[206]. Para além do estriado estão também descritas perdas neuroniais importantes no globo pálido e núcleo sub-talâmico[207]. A perda

neuronial no estriado acompanha-se de "gliose reactiva", que resulta numa alteração da relação neurónio/astrócito de 1/3,5 para 1/10[147,207]. Esta "gliose" tem sido posta em dúvida dado que na realidade existe uma redução do número absoluto de astrócitos, embora muito menos marcada do que a que se observa para os neurónios[139]. O atingimento mais precoce e notável do estriado foi confirmado por estudos de tomografia de emissão de positrões (PET). De facto, verificou-se uma redução da utilização da glicose no estriado em casos nos quais a tomografia computorizada cerebral ainda não mostrava qualquer atrofia da cabeça do núcleo caudado[99,265] isto mesmo se observou também em alguns indivíduos assintomáticos passíveis de serem portadores do gene da doença de Huntington [100,152]. Os neurónios do estriado mais atingidos são os espinhosos de tamanho médio (tipo II de Golgi), que correspondem a cerca de 90% dos neurónios do estriado (neurónios de projecção); a relação neurónios grandes/neurónios médios, que é normalmente de 1/175, aumenta drásticamente para 1/40 [139].

Em resumo, na doença de Huntington existe uma perda neuronial que tem a sua expressão máxima nos ganglios da base, atingindo essencialmente os neurónios tipo II de Golgi.

Etiopatogenia

A causa desta "perda neuronial precoce geneticamente determinada" [148] tem sido procurada exaustivamente. As teorias de uma alteração difusa de membrana, tão em voga na década de 70[40,177],

não foram confirmadas posteriormente[148,237]. Actualmente, a hipótese mais aceite é a da neurotoxicidade dos ácidos aminados neurotransmissores excitatórios endógenos, principalmente do glutamato[73,149] e do aspartato[50]. Os níveis tecidulares de glutamato, mediador excitatório das aferências cortico- e tálamo-estriadas, encontram-se diminuídos no estriado[75]. Contudo, a valorização deste facto torna-se díficil, pois o glutamato intervem no metabolismo intermediário de vários sistemas celulares, tanto da glia como dos neurónios[75]. Estudos da actividade da aminotrasférase da ornitina, enzima localizada particularmente nos neurónios glutamatérgicos, indicam que parte da redução das concentrações de glutamato em várias áreas corticais se possa dever à perda deste tipo de neurónios[262]. Este facto estaria em concordância com a perda dos neurónios observada nas camadas III, V e VI do córtex cerebral[206]. Porém, os estudos de receptores para o glutamato no córtex cerebral e no estriado indicam uma preservação dos neurónios glutamatérgicos na doença de Huntington, que se acompanha de redução do número de receptores para o glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) no estriado e de neurónios pós-sinápticos[91,264]. Os resultados até agora obtidos são tão fragmentários que não permitem identificar a presença duma alteração da transmissão glutamatérgica na doença de Huntington. Contudo, existem fortes indícios de que a patogenia da doença esteja relacionada com a actividade neurotóxica da transmissão glutamatérgica, essencialmente no que se refere à activação dos receptores para o glutamato do tipo NMDA[38,80,81,130,187]. Vários autores relacionam esta acção neurotóxica selectiva com a preservação de certos outros tipos

de neurónios nesta doença[73,80,81,130,238]. É também nesta hipótese que se baseia a produção de modelos experimentais de doença de Huntington com ácido caínico, quinolínico, iboténico, etc.[20,21,56,154].

Nesta perspectiva, o uso de antagonistas dos receptores NMDA poderia conferir um efeito protector, retardando a progressão da doença[50,222,248].

Doença de Huntington e neurotransmissores

A perda neuronial observada nesta doença parece atingir os neurónios de projecção do estriado para o globo pálido e substância negra, que utilizam o ácido gama-amino-butírico (GABA), a substância P, a dinorfina e a metionina-encefalina como mediadores[2]. De facto, no tecido cerebral obtido por necrópsia, observa-se uma diminuição importante destes mediadores[19,27,28,75,76,117,118,120,148,188,231,244], a qual parece ser independente da forma como o processo de morte decorre, isto é, na presença ou ausência de estado agónico terminal[41,42,232]. Os estudos sobre receptores confirmam alguns destes aspectos, pois mostram um aumento dos receptores para o GABA no globo pálido e substância negra, explicado pela perda da transmissão gabaérgica com origem no estriado e que se projecta para estas estruturas[77,143,185,249,260].

A transmissão colinérgica cerebral, avaliada pela actividade da acetil-transférase da colina, encontra-se diminuída[27,28,231]. Contudo, a validade deste indicador tem sido recentemente posta em dúvida[17,79,97]. Segundo estes autores, a redução da actividade da CAT

corresponde à perda de terminais sinápticos. Novas técnicas têm revelado uma actividade normal da acetilcolinestérase nesta doença[97], sugerindo integridade dos neurónios colinérgicos. Estes resultados estão de acordo com os estudos anatomopatológicos que referem não existir perda apreciável de neurónios estriatais não espinhosos de tamanho grande[206]. A densidade de receptores muscarínicos encontra-se reduzida no estriado [77,112,185,260]; contudo, e mais uma vez, este facto parece estar relacionado essencialmente com a perda de neurónios pós-sinápticos.

Os interneurónios não espinhosos de tamanho médio, que utilizam como mediadores a somatostatina e o neuropeptídeo Y, estão íntegros, havendo mesmo um aumento da concentração de somatostatina no tecido cerebral destes doentes[5,17,18,22].

As concentrações de colecistocinina, provável co-mediador do GABA, estão reduzidas no globo pálido e substância negra[148] e não alteradas no estriado[17].

Quanto ao sistema dopaminérgico, muitos estudos apresentam resultados discordantes[10]. Quando se determina a concentração da dopamina no tecido cerebral de doentes que morreram com doença de Huntington, os resultados não são conclusivos. Uns autores encontram concentrações elevadas[17,157,183,130,231], outros normais[24,28,200] e ainda outros diminuidas[25,126].

O estudo dos metabolitos da dopamina no tecido cerebral tem-se limitado praticamente à determinação das concentrações de

ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (ácido homovanílico ou HVA), as quais se encontram dentro de valores normais ou diminuídas[25,126,157,200].

O doseamento no líquido céfalo-raquidiano (LCR) deste metabolito da dopamina tem sido outro meio de estudo utilizado para determinar o estado da transmissão do sistema dopaminérgica na doença de Huntington. No entanto tal como se verificou no tecido cerebral, uns autores encontraram no LCR valores normais[128,136], enquanto que outros os encontraram diminuídos[44,48,62,64,233]. Estes resultados têm levado muitos autores a defenderem a tese de que a actividade do sistema dopaminérgico se encontra diminuída na doença de Huntington[27,60,126].

As investigações sobre receptores para a dopamina não têm elucidado este problema, já que os diversos estudos apontam para uma perda dos dois tipos de receptores da dopamina, D1 e D2, com um predomínio franco da perda dos receptores D1[58,96,115,260]; este resultado é lógico se se atender ao facto de que os neurónios dopaminérgicos estão poupados e os neurónios sobre os quais a dopamina vai actuar se encontram reduzidos em número (o que provocaria uma perda preferencial dos receptores com localização pós-sináptica). Em resumo, os resultados dos estudos sobre receptores indicam essencialmente que há perda de neurónios pós-sinápticos sobre os quais a dopamina actua.

Por outro lado, os estudos enzimáticos realizados mostram que no estriado há aumento[27]ou normalidade[1,28]da actividade da hidroxílase da tirosina, enzima biosintética da dopamina. Em relação à actividade da monaminoxídase (MAO), os estudos apontam para

um aumento da actividade da MAO de tipo-B (MAO-B) e para a não modificação da actividade da MAO de tipo-A (MAO-A)[145,236]. As informações àcerca da actividade da catecol-O-metiltrasférase (COMT) nesta doença são escassas. Os poucos estudos referidos na literatura sugerem normalidade da actividade desta enzima[124]. Conhece-se que esta enzima se apresenta sob duas formas: a solúvel e a membranosa. A forma solúvel localiza-se em elementos não neuroniais (glia, células ependimárias ventriculares e plexos coroideus), enquanto que a membranosa se situa em elementos neuroniais, não aminérgicos, pós-sinápticos[203]. A forma solúvel serviria de barreira enzimática à difusão livre das catecolaminas; a forma membranosa teria como papel a inactivação das aminas libertadas do neurónio pré-sináptico[132]. Ao meditar-se sobre estes problemas, é importante não esquecer, na interpretação dos valores das concentrações dos metabolitos da dopamina na doença de Huntington, o papel das duas variedades da COMT.

Apesar dos resultados discordantes que acabamos de referir, a integridade do sistema dopaminérgico na doença de Huntington foi demonstrada em diversos estudos anatmopatológicos[147], e confirmado em estudos de PET[142]. A observação de que os únicos fármacos capazes de influenciar alguns dos sintomas desta doença serem aqueles que possuem actividade sobre o sistema dopaminérgico[13,16,113,195]e o facto de todas as tentativas terapêuticas baseadas em fármacos com actividade sobre os sistemas gabaérgico, colinérgico, etc., terem falhado[14,85,93,215,223], levou a pensar que a actividade do sistema dopaminérgico cerebral se pudesse encontrar

aumentada nesta doença, o que se adequa à possibilidade do sistema dopaminérgico nigro-estriado se encontrar desinibido devido à perda dos neurónios gabaérgicos[15].

De facto, parece não existir nenhuma evidência de que haja uma diminuição na actividade do sistema dopaminérgico nesta doença e há fortes indícios que este possa estar, pelo contrário, hiperfuncionante.

Na verdade, os resultados do doseamento da dopamina na doença de Huntington divergem de autor para autor e estão sujeitos a diferentes interpretações de acordo com o grau de atrofia existente no estriado, não havendo dúvida de que a determinação das concentrações da dopamina no tecido cerebral se tem mostrado um indicador pouco seguro da actividade dopaminérgica nesta doença. Por outro lado, a corrente utilização do HVA como índice da actividade dopaminérgica é manifestamente inadequada. Em primeiro lugar, o HVA é um metabolito secundário com origem em dois dos metabolitos primários da dopamina, o ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e a 3-metoxitiramina (3-MT), o que leva a que nem sempre a interpretação das suas concentrações possa ser feita, quando quantificado isoladamente[263]; em segundo lugar, no caso particular desta doença, acresce o facto de o HVA ser um metabolito que se forma fora do neurónio dopaminérgico[132]e, por tal, poder refletir alteração de funções estranhas aos sistemas dopaminérgicos cerebrais.

A 3-MT é um metabolito "minor" da amina essencialmente na fenda sináptica de dopamina libertada e por isso mesmo é o indicador mais adequado da libertação da dopamina (ver Wood e

Altar, 1988[263]). Por outro lado, a assunção, que levou a maioria dos autores a utilizar o DOPAC como um índice da libertação ou utilização da dopamina[132,218]tem, recentemente, suscitado várias dúvidas. De facto, diversos autores têm posto em dúvida a via clássica da metabolização da dopamina no que se refere á formação do DOPAC e, por isso mesmo, questionam a utilização deste metabolito como um indicador da libertação da dopamina[196,225,267].

Perante as dificuldade na interpretação dos doseamentos da dopamina e HVA realizados tanto no tecido cerebral, como no LCR de doentes afectados de doença de Huntington, pareceu-nos importante esclarecer este aspecto controverso, através da quantificação de dopamina livre e seus metabolitos, não apenas do HVA, mas também do DOPAC e da 3-MT no LCR de doentes afectados de doença de Huntington. Como os resultados preleminares deste estudo[226]indicavam a presença de um aumento sistemático do DOPAC e dado que recentemente têm surgido dúvidas acerca da origem do DOPAC, pareceu-nos essencial clarificar este aspecto de forma a que, a interpretação dos resultados obtidos por doseamento da dopamina e metabolitos no LCR, pudesse ser correcta. Com esse objectivo procedemos a um estudo de libertação, formação e metabolismo da dopamina com a orientação específica de esclarecer qual a fonte de dopamina implicada na origem do DOPAC.

Em relação a outros sistemas monaminérgicos cerebrais, nomeadamente noradrenérgico e 5-hidroxitriptaminérgico, os

estudos referidos na literatura são também inconclusivos. Estes estudos baseiam-se nos resultados da quantificação destas aminas no tecido cerebral[25,126,201,231] e dos seus metabolitos, respectivamente o 3-metoxi-4-hidroxi-fenilglicol (MHPG) e o ácido 5-hidroxiidolacético (5-HIAA) no LCR[44,48,64] de doentes afectados de doença de Huntington. Por estas razões, procedemos também à quantificação das concentrações de noradrenalina, 5-hidroxitriptamina e seus metabolitos com o objectivo de avaliar a actividade dos respectivos sistemas nesta doença. À semelhança do que tem sucedido com o DOPAC, existem actualmente dúvidas acerca da origem de 5-HIAA[199,261], por isso e pelas mesmas razões enunciadas em relação ao DOPAC procedemos a estudos, no animal, de formação e metabolização da 5-hidroxitriptamina.

Nesta conformidade a nossa investigação incidiu em duas vertentes:

1- Estudo da libertação, formação e metabolismo da dopamina cerebral em animais de experiência, com o fim de determinar qual o real significado do DOPAC como indicador da actividade dopaminérgica cerebral. Paralelamente fora realizados estudos no sentido de clarificar qual a origem do 5-HIAA.

2- Determinação das concentrações de dopamina e seus metabolitos no líquido céfalo-raquidiano de doentes afectados de doença de Huntington, com o objectivo de

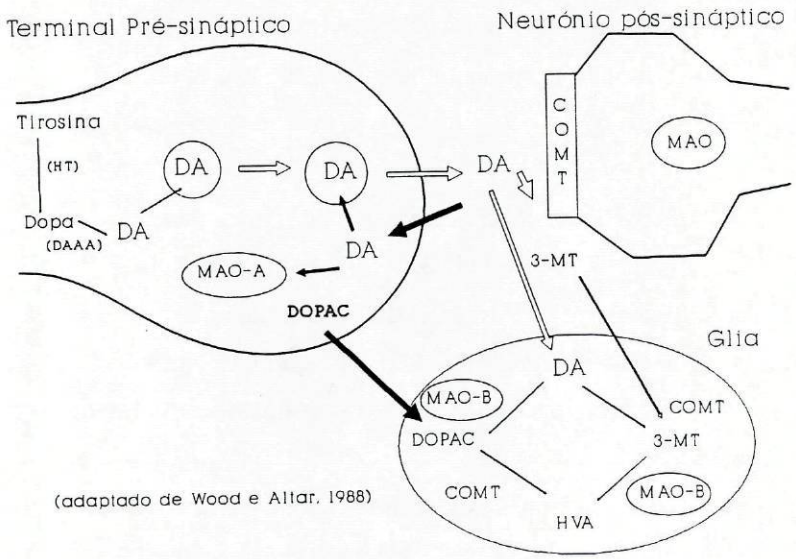
avaliar, em paralelismo com o estudo experimental, qual o melhor índice da actividade dopaminérgica nesta doença. Ao mesmo tempo determinaram-se também as concentrações de noradrenalina, 5-hidroxiptamina e seus metabolitos com o objectivo de avaliar a actividade dos respectivos sistemas nesta doença.

II - Capítulo 1

Parte experimental

Introdução

Segundo o que classicamente se considera a propósito da libertação, formação e e metabolismo da dopamina (esquema 1), a sua formação ocorre no axoplasma por acção da hidroxílase da tirosina (HT), que promove a hidroxilação da tirosina em diidroxifenilalanina (DOPA); esta por sua vez é descarboxilada por acção da descarboxílase dos ácidos aminados aromáticos (DAAA) em dopamina (DA). A dopamina entretanto formada é incorporada em vesículas neuroniais de onde é libertada durante o processo de activação nervosa.



Esquema 1- Metabolismo da dopamina

A dopamina libertada para a biofase pelos neurónios pré-sinápticos pode ser captada para esses mesmos neurónios e novamente incorporada em vesículas. A amina restante é intensamente metabolizada:

- em DOPAC por desaminação pela MAO, após a sua captação para os neurónios pré-sinápticos;
- em 3-metoxitiramina (3-MT) por O-metilação pela COMT na fenda sináptica;
- em DOPAC por desaminação pela MAO ou em 3-MT por O-metilação pela COMT, após captação por elementos não neuroniais (glia);
- em HVA por O-metilação do DOPAC (pela COMT) e desaminação da 3-MT (pela MAO), cuja formação parece depender essencialmente de elementos não neuroniais.

É com base neste esquema que as concentrações no tecido cerebral e no LCR do DOPAC e principalmente do HVA, produto final da metabolização da dopamina, são usadas desde há muitos anos como indicadores de libertação da dopamina[15].

No entanto, para que tal se assuma como legítimo seria necessário que:

- os mecanismos de síntese e armazenamento da dopamina evitassem a degradação da amina até ao momento da sua libertação para a fenda sináptica;

- a captação da amina se fizesse para um compartimento

intracelular onde a sua metabolização pudesse ter lugar;

- a desaminação pela MAO e a O-metilação pela COMT ocorresse apenas após a sua libertação[132].

O HVA, como já se referiu, é um metabolito secundário da dopamina, que se forma fora do neurónio dopaminérgico (essencialmente na glia), quer através da desaminação da 3-MT, quer através da O-metilação do DOPAC; por esta razão é um deficiente indicador da libertação da dopamina, apesar de ser um dos metabolitos "major" da dopamina cerebral[15,263].

A 3-MT, metabolito "minor" da dopamina cerebral[257], forma-se fora do neurónio dopaminérgico por O-metilação pela COMT da dopamina libertada, quer na fenda sináptica quer nas células gliais, sendo por isso um indicador adequado da libertação da amina, (para revisão ver Wood & Altar, 1988).

No entanto, nos últimos anos tem-se acumulado factos muito sugestivos de que a formação do DOPAC não obedece às premissas acima descritas e por tal poderá não ser considerado como um indicador válido de libertação da dopamina[33,92,196,225,247,256,257].

Problema semelhante tem sido colocado em relação ao ácido 5-hidroxindolacético (5-HIAA), considerado geralmente como indicador da libertação da 5-hidroxitriptamina[65,86,111,144,160,212]. Contudo, tal como para o DOPAC e pelas mesmas razões, existem indícios de que este metabolito não deverá ser encarado dessa

forma[199,261].

A principal finalidade da parte experimental das nossas investigações foi a de determinar qual a origem do DOPAC; sendo este um dos principais metabolitos da dopamina cerebral[70], só o conhecimento da sua origem poderá, na realidade, esclarecer que relação haverá entre a formação do DOPAC e a libertação da dopamina. A 1ª, 2ª e 3ª séries experimentais estão dedicadas a este objectivo.

Em paralelo, foram realizadas também experiências, com protocolo idêntico ao utilizado na 2ª e 3ª séries experimentais, com o fim de verificar se o significado das concentrações do 5-HIAA em relação ao metabolismo da 5-hidroxitriptamina era semelhante ao do DOPAC em relação à dopamina (4ª série experimental).

Material e Métodos

Nesta secção descreve-se apenas a metodologia comum a todas as experiências realizadas de forma a evitar repetições. Nos capítulos respectivos descrevem-se os pormenores metodológicos referentes a cada série experimental.

Animais

As experiências foram realizados em ratos machos Wistar (Biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras), com pesos variando entre os 250 e 300 gramas. Os animais estavam alojados em jaulas apropriadas (3 por jaula), em condições ambientais controladas (ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura ambiente de 24°C). Alimento e água eram fornecidos "ad libitum". As experiências foram realizadas durante o dia.

Dissecção

Os ratos foram sacrificados por decapitação, os cérebros rapidamente removidos e colocados em placas de vidro arrefecidas em gelo. Separou-se o cérebro através de um corte coronal a nível do bordo anterior da protuberância. Da parte caudal, separou-se o cerebelo, que foi rejeitado, isolando-se a porção mesencefálica do tronco cerebral. Na parte rostral fizeram-se dois cortes para-sagitais 4 mm para fora da linha média. O bloco central assim obtido foi dividido em duas partes iguais através de um corte

sagital. Procedeu-se então à dissecção do córtex pré-frontal, do córtex parietal, do estriado e de fatias contendo o *nucleus accumbens*, de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1982)[182].

Método analítico

A quantificação da dopamina, 5-hidroxitriptamina, noradrenalina, DOPAC, HVA, 3-MT, 5-HIAA e MHPG foi realizada por cromatrografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica (HPLC-ECD). O sistema de cromatografia consistiu numa bomba (Gilson, modelo 302) conectada a um módulo manométrico (Gilson, modelo 802 C) e a uma coluna ODS de aço inoxidável (Biophase) de 25 cm de comprimento, contendo gel de partículas de sílica com 5 μm de diâmetro. As amostras, depois de preparadas, foram injectadas através de um injector automático (Gilson, modelo 231) ligada a um diluidor Gilson (modelo 401). A detecção foi realizada electroquimicamente numa célula de fluxo laminar com um elétrodo de trabalho de carvão vitrificado, um elétrodo de referência de Ag/AgCl e um detector amperométrico (modelo 304 LC-4A, Bioanalytical Systems). O potencial do detector foi de 0,75 V. A corrente produzida foi monitorizada num integrador Spectra Physics (modelo SP4270). A fase móvel utilizada consistiu numa solução desgaseificada de ácido cítrico (0,1 mmol/l), octilsulfato de sódio (0,5 mmol/l), acetato de sódio (0,1 mol/l), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; 0,15 mmol/l), dibutilamina (1 mmol/l) e metanol (10% v/v), a um pH de 3,5 e

bombeada a um fluxo de 1,0 ml/minuto.

Soluções padrão de 5-hidroxitriptamina, dopamina, noradrenalina, 5-HIAA, DOPAC, 3-MT, HVA, MHPG e diidroxibenzilamina (DBA), injectadas em concentrações crescentes, mostraram um aumento linear da altura dos picos. O coeficiente de variação entre as diversas determinações foi menor que 5%. Nas condições experimentais utilizadas, o limite inferior de detecção para a dopamina, DOPAC, HVA, 5-hidroxitriptamina e 5-HIAA foi respectivamente de 4, 4, 4, 10 e 20 ng/g, nas experiências em que se determinaram concentrações tecidulares. Nas experiências em que se determinaram concentrações em líquidos de superfusão o limite inferior de detecção para a dopamina e DOPAC eram respectivamente de 10 e 20 pg por 50 μl de solução injectada. Os cálculos baseiam-se na taxa de extração observada para o padrão interno, a DBA, adicionado à amostra. A taxa de recuperação observada em cada amostra foi sempre de cerca de 95%.

Análise estatística

Os resultados são expressos em média e erro padrão da média (EPM) para o número indicado de experiências; *n* é o número de experiências (igual ao número de fatias de cérebro). O significado estatístico foi determinado através do teste *t* de Student para valores não emparelhados ou pelo método de Tuckey-Kramer; a probabilidade menor que 0,05 foi assumida como estatisticamente significativa.

Proveniência dos fármacos e produtos químicos

Os seguintes compostos foram provenientes de Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo, U.S.A; Diidroxibenzilamina (DBA), ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), cloridrato de dopamina, ácido homovanílico (HVA), sal dissódico de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), cloridrato de pargilina, ácido 5-HIAA, cloridrato de 5-hidroxitriptamina, 6-fluortriptofano (6-FT), RS-sulpiride, cloridrato de tropolona e l-alfa-metil-p-tirosina.

O cloridrato de clorgilina foi gentilmente cedido por May and Baker, Ltd, Dagenham, UK e a selegilina ((-)-deprenilo) foi uma oferta do Professor J.Knoll, do Departamento de Farmacologia da Universidade Semmelweiss de Medecina, Budapeste, Hungria.

A origem dos restantes produtos foi a seguinte: GBR12909 (cloridrato de (1-[2-[bis(4-fluorfenil) metoxi]etil]-4-(-fenilpropil)piperazina), Research Biochemical Inc., Natick, Massachusetts, U.S.A.; cloridrato de cocaína, Uquipa, Lisboa, Portugal; cloridrato de quinpirole, Lilly Research Laboratories, Indiana, IN, U.S.A..

1ª SÉRIE EXPERIMENTAL

Estudo do efluxo da dopamina e do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no tecido cerebral de Rato, induzido por estimulação eléctrica, despolarização pelo potássio e activação da libertação dependente de um transportador transmembranoso.

O DOPAC é o principal metabolito da dopamina no SNC e tem origem na degradação do transmissor pela MAO; por sua vez, o metabolito desaminado da dopamina pode ser O-metilado pela COMT em HVA.

O principal argumento em favor da utilização das concentrações do DOPAC como indicador da libertação da dopamina, no tecido cerebral e LCR, tem como fundamento os resultados descritos por Roth e col. (1976)[208]. Estes autores referem o facto de a inibição da captação da dopamina com a benzotropina reduzir, em condições basais e em condições de estimulação eléctrica da via nigro-estriada, a formação de DOPAC em 25 e 50%, respectivamente. Com efeito, estes resultados são de molde a sugerir que a desaminação da dopamina somente ocorre após a libertação da amina. Contudo, foi demonstrado posteriormente, de forma inequívoca, que o uso de diferentes bloqueadores da captação neuronial não provoca qualquer redução da formação de DOPAC[33,92,196,225,247,256,257]. Por outro lado, as novas técnicas de diálise cerebral vieram mostrar uma dissociação entre o efluxo da dopamina e dos seus metabolitos após a administração de fármacos susceptíveis de modificar a transmissão dopaminérgica cerebral[256,267,268,269]. Isto mesmo foi demonstrado em estudos *in vitro* realizados numa preparação de lobo intermediário

da hipófise, preparação que contem uma grande densidade de neurónios dopaminérgicos[197]. Os resultados de todos estes estudos sugerem que a formação de DOPAC poderá ter lugar antes de decorrer a libertação da dopamina. A importância dos estudos *in vivo*, nomeadamente dos recentes estudos de diálise cerebral, é sem dúvida enorme; porém neste tipo de estudos não se podem controlar determinados parâmetros, tais como a fracção de metabolitos que são transportados pela corrente sanguínea[109]. Por outro lado, apenas através da utilização de preparações *in vitro* se poderá manipular farmacologicamente a influência do estímulo que promove a libertação do transmissor, isto é, umas vezes provocando a libertação por exocitose, outras vezes através de um transportador de membrana.

O presente estudo foi realizado com a intenção de observar qual a influência no efluxo da dopamina e do DOPAC endógenos de estímulos que promovem a libertação de dopamina por diferentes mecanismos (estimulação eléctrica, despolarização pelo potássio e activação da libertação mediada por transportador transmembranoso); em algumas das circunstâncias experimentais foi inibida a captação neuronial da dopamina e em outras utilizaram-se estímulos potenciadores ou inibidores da libertação neuronial da amina. Desta forma, pretendeu-se verificar se a formação do DOPAC ocorre intraneuronialmente após a libertação, seguida de captação neuronial, da amina que lhe dá origem ou se, porventura, a desaminação da dopamina pode ter lugar antes que a amina possa ser libertada para a biofase.

Material e Métodos

As fatias de tecido cerebral contendo o estriado ou o *nucleus accumbens*, de aproximadamente 500 μm de espessura e 2 mm de diâmetro, foram colocadas em câmaras de superfusão, onde foram fixadas por uma rede de propileno entre elétrodos de platina separados de 10 mm. As fatias foram superfundidas com um meio previamente aquecido a 37°C e oxigenado (95% de oxigénio e 5% de dióxido de carbono), a um fluxo constante de 1 ml/min através de uma bomba Gilson Minipulse. A COMT foi inibida desde o início da superfusão, pela tropolona, adicionada ao meio de superfusão na concentração de 30 μmol/l. O fluído de superfusão, durante os primeiros 60 minutos foi rejeitado (período de estabilização da preparação); a partir de aí, procedeu-se à colheita do fluído de superfusão cada 2 ou 4 minutos. Os estímulos utilizados para promover a libertação da dopamina foram a estimulação eléctrica, a despolarização pelo potássio e a aplicação de um gradiente favorável de sódio. Na maioria das situações o meio de superfusão era composto por (em mmol/l): NaCl- 118, KCl- 4,7, $CaCl_2$- 2,4, $MgSO_4$- 1,2, $NaCHO_3$- 25, KH_2PO_4- 1,2 e glicose- 11. Adicionou-se ao meio EDTA (40 μmol/l), por forma a prevenir a oxidação espontânea das catecolaminas.

1 - Perda espontânea

O primeiro grupo de experiências serviu de controlo: para isso superfundiram-se fatias de estriado e colheram-se amostras a partir do fim do período de estabilização durante 20 minutos; o efluxo correspondente à perda espontânea de dopamina e DOPAC era colhido cada 2 minutos. Simultaneamente superfundiram-se fatias de estriado com um meio ao qual se adicionou cocaína (10 μmol/l) desde o início da superfusão.

2 - Estimulação eléctrica

Nas experiências de superfusão de estriado em que se utilizou a estimulação eléctrica, no período de pré-estimulação, procedeu-se à colheita, cada 2 minutos, de 3 amostras do fluído de superfusão. Durante o quarto período de colheita as fatias foram estimuladas electricamente (2 minutos), após o que se realizaram mais cinco colheitas, correspondentes aos períodos de pós-estimulação. O estímulo usado consistiu em pulsos rectangulares com 3 milisegundos de duração, com 24 mA de intensidade a uma frequência de 5 Hz, através de um estimulador Hugo Sachs (modelo 215/II). Os pulsos foram monitorizados num osciloscópio. Algumas destas experiências foram realizadas na presença de um bloqueador da captação neuronial para a dopamina, o GBR 12909 (100 nmol/l), adicionado ao meio desde o início da superfusão até ao fim da experiência. Noutras experiências, com a utilização do

estriado ou do *accumbens*, as fatias foram estimuladas eléctricamente (3 ms, 24 mA, 5 Hz) durante 28 minutos e o efluente colhido cada 4 minutos; a perda espontânea foi colhida no período de 4 minutos imediatamente anterior ao início da estimulação. Nestas experiências superfundiram-se em paralelo 4 amostras: a primeira serviu de controlo, as outras três foram estimuladas conforme descrito. Em duas adicionou-se ao meio, desde o início da superfusão até ao fim da experiência, um antagonista dos receptores da dopamina, o sulpiride (1 μmol/l) ou um agonista dos receptores dopaminérgicos, o quinpirole (0.1 μmol/l).

3 - Despolarização pelo potássio.

A despolarização pelo potássio foi realizada, em fatias de estriado, com um meio enriquecido em potássio (52 mmol/l) por um período de 10 minutos e o fluído de superfusão colhido cada 2 minutos; 40% de NaCl foi substituido por KCl ficando o meio, respectivamente, com 71 e 52 mmol/l. A perda espontânea de dopamina e DOPAC foi estudada em experiências paralelas em que não se procedeu à despolarização das preparações. Em algumas experiências adicionou-se ao meio sulpiride (1 μmol/l) desde o início da superfusão até ao fim da experiência.

4 - Libertação da dopamina através de um transportador transmembranoso.

Nas experiências em que a libertação da dopamina se

promoveu através de um gradiente favorável de sódio, fatias de estriado foram superfundidas com um meio contendo concentrações decrescentes de NaCl (118, 78, 39 e 0 mmol/l) e o fluído de superfusão colhido cada 4 minutos. O meio contendo 118 mmol/l de NaCl correspondeu á experiência de controlo. A osmolaridade do meio de superfusão com redução das concentrações de sódio foi mantida constante pela substituição do NaCl por sacarose. Nestas experiências omitiu-se do meio de superfusão o $CaCl_2$, por forma a evitar, por essa via, a activação de mecanismos exocitóticos de libertação.

Nos 4 tipos de experiências descritos, o meio de superfusão foi colhido em tubos de 10 ml arrefecidos contendo 0,2 ou 0,4 ml de ácido perclórico (1 mol/l). No fim da superfusão os tecidos foram retirados da câmara, pesados, colocados em 500 μl de ácido perclórico (0,1 mmol/l) e congelados até serem analisados, no período de uma semana.

Em todas as experiência, a cada amostra de fluído de superfusão adicionaram-se 50 mg de alumina e o pH foi imediatamente ajustado a 8,6 com a adição de tampão TRIS. Após 10 minutos de agitação mecânica, procedeu-se à centrifugação e rejeição do sobrenadante. As catecolaminas adsorvidas foram então eluídas num filtro Millipore (MF 1) com 200 μl de ácido perclórico (0,1 mmol/l) e 50 μl do eluído foram injectados no sistema de HPLC-ECD. A determinação das concentrações da dopamina e do seu metabolito desaminado, o DOPAC, no meio de superfusão foi realizada por HPLC-ECD, conforme já descrito.

Resultados

1 - Perda espontânea.

A perda espontânea de dopamina e DOPAC nas fatias de estriado de Rato foi de, respectivamente, 2,5 ± 0.1 e de 15,3 ± 0,9 pg/mg.min-1 (n=40), em experiências nas quais as fatias de estriado foram superfundidas durante 20 minutos. Como se mostra na figura 1, o efluxo da dopamina e do DOPAC decresceu ligeiramente para o fim do período de colheita. Quando os tecidos foram superfundidos por períodos mais longos (experiências de controlo em paralelo com experiências de libertação) obteve-se uma perda espontânea estável (figura 3A e linha ponteada da figura 6). O efluxo espontâneo obtido no *nucleus accumbens* (ver figura 4A) foi de 3,0±0,1 e 30,3±0,6 pg/mg.min-1 para a dopamina e para o DOPAC, respectivamente.

A adição da cocaína ao meio de superfusão resultou em aumento significativo do efluxo da dopamina, acompanhada de ligeira diminuição dos níveis do DOPAC, como se mostra também na figura 1.

Quando se usou um bloqueador da captação neuronial da dopamina mais selectivo, o GBR 12909, obtiveram-se resultados semelhantes (ver figura 2).

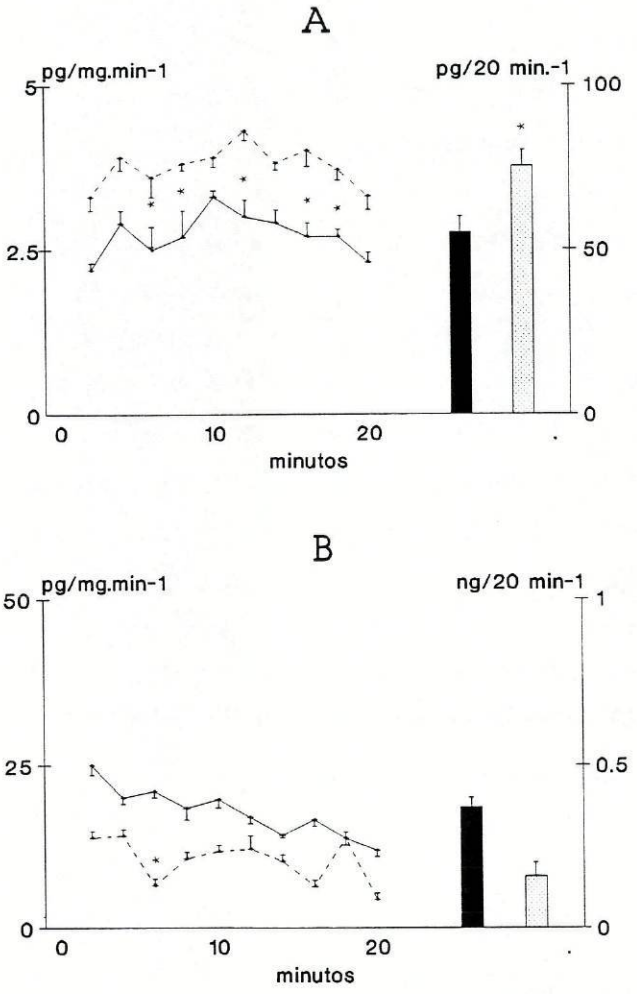


Figura 1. Efeito da cocaína (10 μmol/l) sobre a perda espontânea de (A) dopamina e (B) DOPAC em fatias de estriado de Rato. Os resultados são apresentados em média $\pm$ EPM de cinco experiências por grupo. As linhas a cheio representam a situação de controlo e a tracejado o efeito da cacaína. As barras representadas à direita correspondem à quantidade total de dopamina e DOPAC colhidos nos 20 minutos de colheita.

* significativamente diferente dos valores de controlo correspondentes (teste *t* de Student para dados não emparelhados: $P < 0,05$).

2 - Estimulação eléctrica.

Como se pode observar na figura 2, a estimulação eléctrica de fatias de estriado durante 2 minutos, do 6° ao 8° minuto, provocou um aumento marcado do efluxo da dopamina. Este aumento foi ainda mais acentuado no período subsequente à estimulação (10 vezes superior ao observado no período de pré-estimulação) e descresceu posteriormente até valores semelhantes aos observados no início da experiência. Pelo contrário, o efluxo de DOPAC durante a estimulação eléctrica foi apenas duas vezes superior ao observado no período de pré-estimulação.

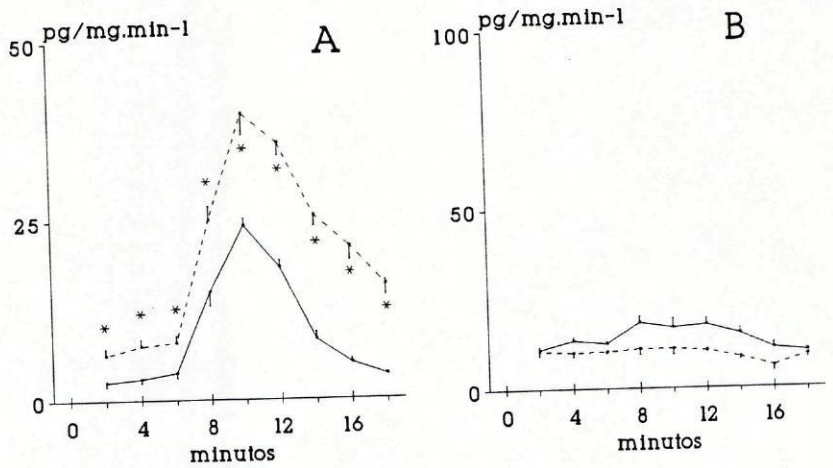


Figura 2. Efeito do GBR 12909 (100 nmol/l) na libertação (A) de dopamina e (B) DOPAC durante a estimulação eléctrica de fatias de estriado de Rato. Os resultados são expressos em média ± EPM de 5 experiências por grupo. As linhas a cheio representam a situação de controlo e a tracejado o efeito do GBR 12909.

* significativamente diferente dos valores de controlo correspondentes (teste *t* de Student para dados não emparelhados: $P<0,01$).

A adição ao meio de superfusão de um bloqueador da captação neuronial para a dopamina, o GBR 12909, aumentou significativamente o efluxo da dopamina em qualquer dos períodos de colheita. O efluxo de DOPAC, durante a estimulação eléctrica e no período subsequente, foi ligeiramente reduzido pela adição de GBR 12909 (figura 2).

Nas experiências em que se procedeu à superfusão de fatias de estriado durante 32 minutos, a perda espontânea de dopamina e DOPAC foi semelhante à observada anteriormente (figura 3A).

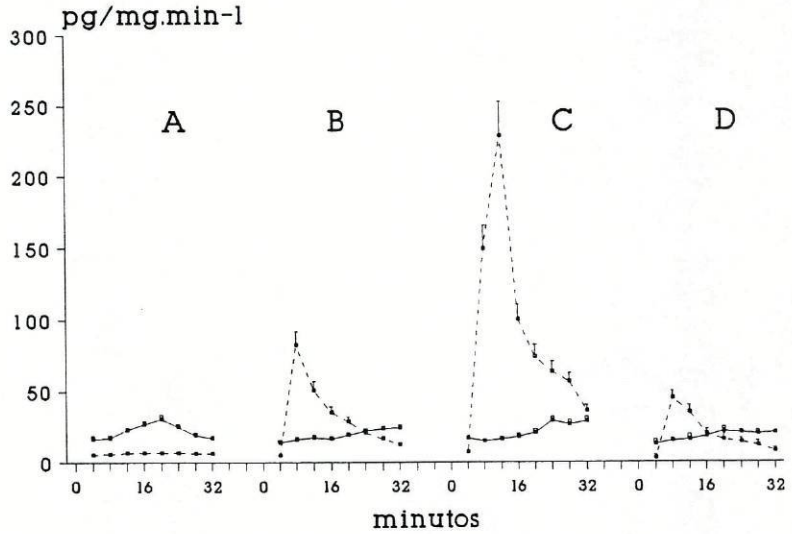


Figura 3. Efluxo da dopamina (linha tracejada) e do DOPAC (linha a cheio) de fatias de estriado de Rato superfundidas durante (A) a perda espontânea, (B) a estimulação eléctrica contínua, (C) a estimulação eléctrica contínua na presença de sulpiride (1 μmol/l) e (D) estimulação eléctrica contínua na presença de quinpirole (0,1 μmol/l). Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM de 5 experiências por grupo.

Nestas experiências, os tecidos foram estimulados electricamente do 4º ao 32º minutos e o efluente colhido de 4 em 4 minutos. Como se observa na figura 3B, a estimulação eléctrica foi acompanhada por um aumento no efluxo da dopamina, sem que tal tenha correspondido a um aumento idêntico no efluxo do DOPAC. O efluxo da dopamina atingiu o seu valor máximo durante o primeiro período de estimulação (20 vezes superior ao observado no período de pré-estimulação) e decresceu progressivamente nos subsequentes períodos de colheita. Observou-se, igualmente, uma tendência para o aumento do efluxo do DOPAC nos últimos períodos de estimulação, mas que não atingiu significado estatístico. Quando se estimularam as fatias de estriado na presença de um antagonista dos receptores pré-sinápticos da dopamina, o sulpiride (1μmol/l), os valores do efluxo da dopamina aumentaram significativamente, em particular durante o 2º período de estimulação (ver figura 3C). A potenciação da libertação da dopamina durante o bloqueio dos receptores pré-sinápticos da dopamina não se acompanhou de aumento dos níveis de DOPAC no efluente. Por seu lado, a activação dos receptores pré-sinápticos da dopamina pelo quinpirole (0,1 μmol/l) resultou em decréscimo significativo da libertação de dopamina induzida por estimulação eléctrica (figura 3D); este efeito foi observado durante todo o período de estimulação. O efluxo do DOPAC nestas experiências foi semelhante ao observado nas experiências de controlo (figura 3A e 3B).

Na figura 4 referem-se os resultados obtidos em fatias de tecido cerebral contendo o *nucleus accumbens* e superfundidas

durante 32 minutos, utilizando o mesmo protocolo experimental descrito para o estriado. A perda espontânea de dopamina (figura 4A) foi semelhante à observada no estriado (figura 3A).

Por outro lado, a perda espontânea do DOPAC foi de cerca de 30 pg/mg.min-1 (figura 4A), valor este superior ao observado para o estriado (figura 3A). A estimulação eléctrica contínua durante 28 minutos deu origem a um aumento do efluxo de dopamina.

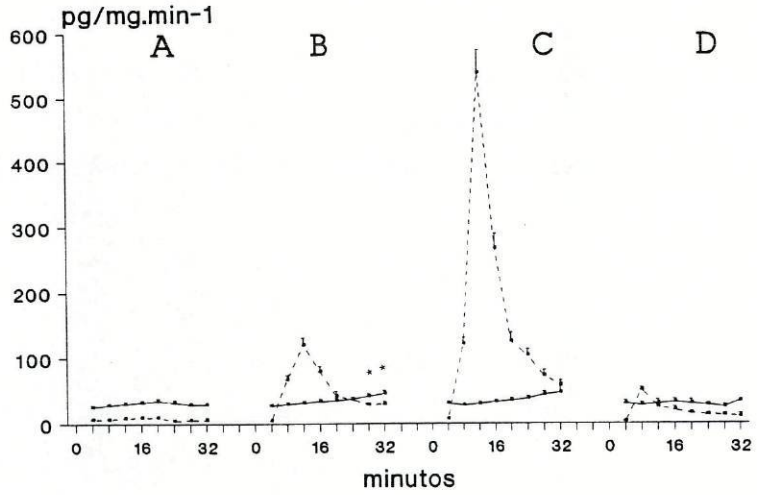


Figura 4. Efluxo da dopamina (linha tracejada) e do DOPAC (linha a cheio) de fatias contendo *nucleus accumbens* de Rato superfundidas durante, (A) perda espontânea, (B) estimulação eléctrica contínua, (C) estimulação eléctrica contínua na presença de sulpiride (1 μmol/l) e (D) estimulação eléctrica contínua na presença de quinpirole (0,1 μmol/l). Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM de 5 experiências por grupo.

* significativamente diferente dos valores de controlo correspondentes (método de Tuckey-Kramer: $P < 0,05$).

Ao contrário do observado no estriado, no *nucleus accumbens* os níveis mais elevados do efluxo da dopamina observaram-se no 2° período de estimulação atingindo valores de cerca de 120 pg/mg.min-1, e descresceram depois até ao fim da experiência (figura 4B). Os níveis do DOPAC no efluxo, durante a estimulação eléctrica, aumentaram progressivamente, atingindo este aumento significado estatístico nos dois últimos períodos de estimulação, quando comparados com os observados na ausência de estimulação eléctrica (figuras 4A e 4B). O bloqueio dos receptores pré-sinápticos da dopamina pelo sulpiride (1 μmol/l) provocou uma potenciação da libertação da dopamina induzida por estimulação eléctrica (figura 4C); este efeito atingiu o seu máximo no 2° e 3° períodos de estimulação e foi cerca de duas vezes superior ao observado no estriado.

A estimulação eléctrica na presença de sulpiride provocou um aumento progressivo dos níveis do DOPAC no efluente ao longo da experiência, atingindo este aumento significado estatístico no último período de estimulação (figura 4C); idêntico aumento já havia sido observado durante a estimulação eléctrica na ausência de sulpiride. Tal como nas experiências anteriores, o valor do efluxo do DOPAC durante a estimulação eléctrica e na presença de sulpiride, foi apenas de duas vezes o valor observado na ausência de activação nervosa. A activação dos receptores pré-sinápticos da dopamina pelo quinpirole (0,1 μmol/l) resultou em decréscimo significativo da libertação da dopamina induzida por estimulação eléctrica, mas não afectou o efluxo de DOPAC (figura 4D).

3 - Libertação induzida pelo potássio.

A despolarização induzida pelo potássio (52 mmol/l) das fatias do estriado de Rato, durante 10 minutos, condicionou um aumento significativo do efluxo de dopamina (figuras 5A e 5B). Contudo, o efluxo de DOPAC durante a despolarização pelo potássio foi idêntico ao observado durante a perda espontânea. A adição de sulpiride ao meio de superfusão contendo um excesso de potássio provocou um aumento ainda maior da libertação da dopamina sem afectar os valores do efluxo do DOPAC (figura 5C).

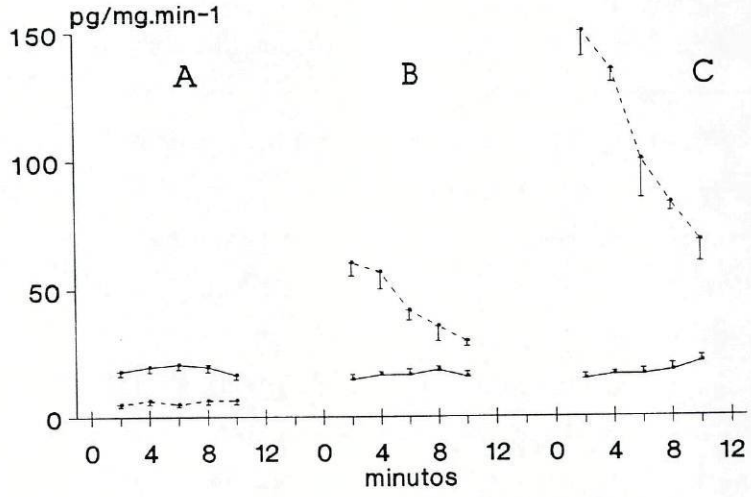


Figura 5. Efluxo da dopamina (linha tracejada) e do DOPAC (linha a cheio) de fatias de estriado de Rato superfundidas, durante (A) a perda espontânea, (B) a despolarização pelo potássio (52mmol/l) e (C) a despolarização pelo potássio (52mmol/l) na presença de sulpiride (1 μmol/l). Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM para 5 experiências por grupo.

4 - Libertação dependente da activação do transportador transmembranoso.

A superfusão de fatias de estriado com um meio sem cálcio e contendo concentrações decrescentes de sódio induziu uma elevação do efluxo da dopamina (figura 6A). As experiências foram realizadas superfundindo-se em paralelo 4 amostras. Testaram-se 4 diferentes concentrações de NaCl. O meio de superfusão contendo 118 mmol/l representava a condição de controlo. O efeito de concentrações decrescentes de sódio no meio de superfusão consistiu num aumento progressivo da libertação da dopamina. Este efeito, com 0 mmol/l de NaCl, atingiu o seu máximo entre o 20º a 24º minutos.

Pelo contrário, os níveis de DOPAC no efluente não foram diferentes dos observados na situação de controlo (figura 6B), salvo nas experiências em que se omitiu completamente o NaCl; neste caso, os valores do efluxo do DOPAC foram duas vezes superior aos observados na situação de controlo, atingindo este efeito significado estatístico.

Discussão.

Os resultados apresentados nesta série de experiências mostram que há perda espontânea de dopamina e de DOPAC, sendo a de este último muito superior à da dopamina.

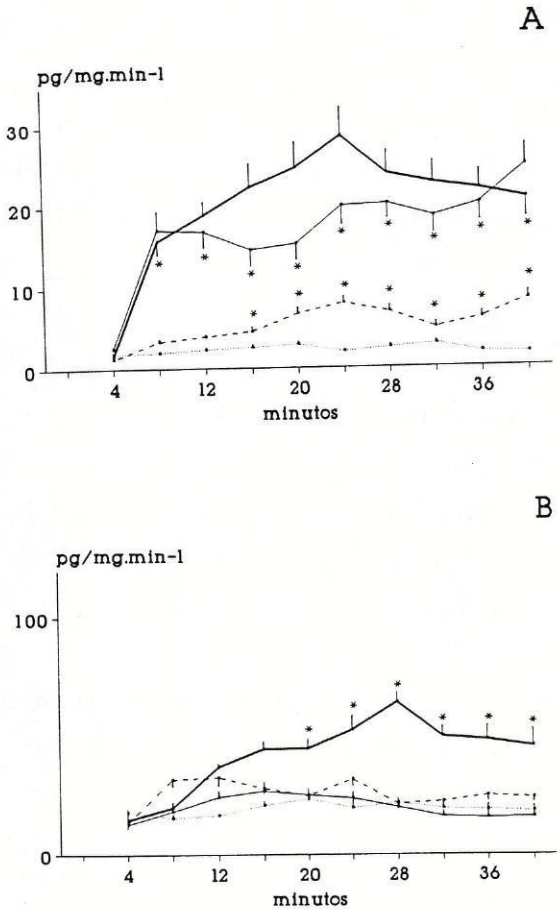


Figura 6. Efluxo da (A) dopamina e do (B) DOPAC de fatias de estriado de Rato superfundidas com meio contendo concentrações decrescentes de cloreto de sódio. Os resultados são expressos em média ± EPM para 4 experiências por grupo. NaCl 118 mmol/l linha ponteada, NaCl 78 mmol/l linha tracejada, NaCl 39 mmol/l linha fina a cheio e NaCl 0 mmol/l linha grossa a cheio.

* significativamente diferente dos valores de controlo correspondentes (método de Tuckey-Kramer: $P<0,05$).

O bloqueio da captação neuronial da dopamina pela cocaína ou pelo GBR 12909[103,216] provocou aumento significativo no efluxo espontâneo da dopamina e pouco alterou o do DOPAC.

O estriado e o *accumbens,* a exemplo do que sucedeu em todas as modalidades experimentais da investigação apresentada nesta Dissertação, foram superfundidos durante os 60 minutos que precederam o início da colheita das amostras. Nesta conformidade, a dopamina, intacta ou desaminada, presente no efluxo espontâneo, só pode representar dopamina de síntese recente (e ainda não armazenada nas vesículas), à qual se poderá eventualmente juntar alguma dopamina que "babe" das vesículas para o axoplasma. No entanto, quantitativamente, esta origem terá muito modesto relevo, conhecida como é a forma como as aminas biogénicas se armazenam nas vesículas[15]. A verificação de que a perda espontânea de dopamina é essencialmente representada por DOPAC ($15.3 \pm 0,9$ $pg/mg.min^{-1}$ contra $2,5 \pm 0,1$ pg/min^{-1} no estriado; $3,0 \pm 0,1$ $pg/mg.min^{-1}$ contra $30,3 \pm 2,6$ $pg/mg.min^{-1}$) poderá sugerir desde logo que uma parte importante da dopamina recém-sintetizada, condições basais, é desaminada em DOPAC antes de ser incorporada nas vesículas. Contudo, poder-se-á objectar que o DOPAC presente no efluxo espontâneo provém de dopamina que saiu do neurónio para o líquido de superfusão e foi depois recaptada para o axoplasma, onde se deu a desaminação em DOPAC. No entanto, nas preparações em que se procedeu à inibição da recaptação neuronial, pela cocaína ou pelo GBR 12909, o aumento da perda espontânea da dopamina, embora moderado, não foi acompanhado, salvo ocasionalmente, de modificação significativa de perda de DOPAC.

Estes resultados, a par de se harmonizarem com a interpretação antes sugerida, indica também que a dopamina presente na biofase é rápida e quase totalmente captada pelos neurónios e ali armazenada nas vesículas e não desaminada no axoplasma.

A libertação da dopamina endógena por exocitose, no estriado e no *nucleus accumbens* não se acompanhou de aumento do efluxo do seu metabolito desaminado, o DOPAC, quer a libertação fosse induzida por estimulação eléctrica quer fosse obtida por despolarização com um meio enriquecido em potássio. Com a captação neuronial bloqueada pelo GBR 12909, a estimulação eléctrica desencadeou um aumento significatico da libertação da dopamina, mas não alterou significativamente o efluxo do DOPAC.

Como seria de esperar, o bloqueio pré-sináptico dos receptores da dopamina[234] resultou em aumento da libertação da amina, induzida por estimulação eléctrica, no estriado e no *nucleus accumbens*, o mesmo se observando durante a despolarização pelo potássio no estriado. A activação destes mesmos receptores pelo quinpirole produziu a típica redução da libertação do transmissor. As alterações da libertação da dopamina pelo antagonismo ou pela activação destes receptores não se acompanhou de alteração do padrão do efluxo do DOPAC.

Estes resultados confirmam a sugestão, já retirada dos dados fornecidos pela determinação da perda espontânea, de que a dopamina libertada, agora por exocitose, é em grande parte recaptada pelos neurónios dopaminérgicos, onde é rápida e quase totalmente armazenada nas vesículas, escapando assim à desaminação pela MAO.

Na verdade, se a dopamina libertada exocitoticamente, por estimulação eléctrica ou por despolarização pelo potássio, fosse desaminada em DOPAC de forma quantitativamente importante, após recaptação neuronial, o efluxo de DOPAC deveria ter aumentado. No entanto, tal não sucedeu. Inversamente, nas experiências em que, a par do estímulo exocitótico, se bloqueou a captação neuronial da dopamina, o efluxo do DOPAC deveria ter diminuido substancialmente, o que também não aconteceu.

Não há dúvida, portanto, de que o DOPAC presente no efluxo não se origina, pelo menos em quantidade significativa, em dopamina libertada e depois desaminada no axoplasma após recaptação neuronial. O DOPAC provém, pois, essencialmente, de dopamina não previamente libertada. De notar que, mesmo quando, por bloqueio dos receptores dopaminérgicos pré-sinápticos pelo sulpiride, se intensificou ainda mais a libertação exocitótica da dopamina, o efluxo do DOPAC não foi, mesmo assim, significativamente modificado. Quando, inversamente, se reduziu, por um agonista dos referidos receptores, o quinpirole, a libertação da dopamina por exocitose, o efluxo do DOPAC continuou a não sofrer alteração significativa. Estes resultados mostram bem que não há relação entre a dopamina libertada e o efluxo de DOPAC.

Encontram-se referidos na literatura alguns resultados que estão de acordo com a nossa interpretação dos resultados que obtivemos. Herdon e Nahorsky (1987)[104] demostraram que a estimulação eléctrica do estriado de Rato não modifica o efluxo do DOPAC tritiado e produz ligeiro aumento na libertação do DOPAC

endógeno. Herdon e col (1985)[105] já préviamente tinham referido fenómenos semelhantes, usando diversos estímulos químicos que promovem a libertação da dopamina. Da mesma forma, Racké e Muscholl (1986)[197] observaram que, numa preparação isolada de lobo intermediário da hipófise, a maioria dos metabolitos da dopamina se originava na amina degradada intraneuronialmente sem libertação prévia. Nesta preparação, a estimulação eléctrica aumentou em 60% a libertação da dopamina e apenas em 16% a libertação do DOPAC; a inibição da captação neuronial aumentou a libertação da dopamina sem aumentar os níveis do DOPAC no efluxo.

Estudos realizados *in vivo*, em que se utilizaram técnicas de microdiálise cerebral, mostram igualmente que os estímulos promotores da libertação da dopamina não se acompanham de elevação dos níveis do DOPAC no dialisado. Zetterström e col (1984)[268] mostraram pela primeira vez dissociação entre os níveis da dopamina e do DOPAC nos dialisados cerebrais em ratos tratados com antagonistas dos receptores da dopamina. De acordo com isto estão também os resultados referidos por Soares-da-Silva (1987)[225], demonstrando que os inibidores da captação neuronial não afectam a formação do DOPAC após a administração de bloqueadores dos receptores da dopamina. Por sua vez Zetterström e col. (1988)[267], em experiências realizados *in vivo*, mostraram que o bloqueio da captação neuronial não reduziu os níveis do DOPAC no dialisado cerebral, enquanto que aumentou significativamente a libertação de dopamina. Os mesmos autores referem que a adição de cloreto de potássio ao meio de perfusão resultou em aumento

da libertação de dopamina; porém, os níveis de DOPAC no dialisado tornaram-se progressivamente mais baixos[267]. Resultados semelhantes foram também referidos por Badoer e col. (1989)[7] em relação à libertação de dopamina, DOPAC, noradrenalina e 3,4-diidroxifenilglicol (DOPEG), metabolito desaminado da noradrenalina, no hipotálamo anterior do Rato; a elevação das concentrações de cloreto de potássio no meio de diálise condicionou um aumento significativo das concentrações de dopamina e noradrenalina e uma redução marcada dos níveis de DOPAC e DOPEG. Estes resultados mostram efectivamente que fracções consideráveis da dopamina e noradrenalina libertadas escaparam à desaminação.

No que se refere à libertação não exocitótica de dopamina verificou-se, em fatias de estriado, que a activação da libertação da dopamina por um mecanismo de transporte transmembranoso, conseguido através da redução das concentrações ou omissão de sódio no meio de superfusão, resultou em aumento significativo na libertação da dopamina, mas sem aumento dos níveis do DOPAC no efluxo.

Estes resultados não são incompatíveis com a nossa visão do problema que temos vindo a discutir. Nas condições experimentais referidas seria de esperar que se observasse uma redução do efluxo do DOPAC. Tal, no entanto, não se verificou nas nossas experiências, nem nas realizadas *in vivo* com a ubaína[255]. A ubaína é um conhecido inibidor da ATPase sódio/potássio e promove a libertação de mediadores através de um mecanismo não exocitótico.

O efeito libertador da ubaína deve-se à activação de um transportador transmembranoso, na sequência da criação de um gradiente favorável de sódio[194]. Um efeito semelhante consegue-se igualmente através da redução das concentrações de sódio no meio de superfusão[198], como nós realizamos nas nossas experiências. Westerink e col. (1989)[255] procederam à infusão de ubaína no sistema de microdiálise cerebral tendo verificado um aumento de cerca de cem vezes nos níveis de dopamina e apenas uma duplicação dos valores dos níveis de DOPAC.

Uma possível explicação para a libertação não exocitótica de dopamina não se acompanhar duma redução do efluxo do DOPAC poderá residir no facto de o ritmo de formação do DOPAC a partir de dopamina recém-sintetizada ser maior do que o da mobilização da amina por este mecanismo de libertação.

Em conclusão:

(a) uma parte importante da dopamina libertada para a biofase é captada para os terminais neuroniais, mas somente uma pequena fracção da amina recém-captada é desaminada em DOPAC;

(b) a quase totalidade do DOPAC forma-se de dopamina que nunca foi libertada do terminal dopaminérgico pré-sináptico;

(c) não tendo a maioria do DOPAC origem em dopamina libertada recentemente, este metabolito não se poderá aceitar como indicador da libertação da dopamina.

2ª SÉRIE EXPERIMENTAL

Estudo cinético da formação de dopamina, ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) no cérebro de Rato: implicações para a origem do DOPAC.

Os resultados das nossas experiências de libertação exocitótica e não exocitótica de dopamina (1ª série de experiências), mostraram que o DOPAC não se origina, pelo menos em quantidades apreciáveis, em dopamina libertada, não havendo, portanto, relação entre a quantidade de amina libertada e a quantidade de DOPAC formado. Por outro lado, os resultados da perda espontânea sugeriram a possibilidade de o DOPAC se formar de dopamina de síntese recente. De facto,nos últimos anos têm-se acumulado indícios de que, em condições de activação das vias dopaminérgicas, o ritmo de formação do DOPAC não é igual ao da formação da amina que lhe dá origem[54,263]. Em experiências em que se induzia a síntese da amina pelos antagonistas dos receptores para a dopamina, Zetterström e col. (1984)[268] e Soares-da-Silva, (1987)[225] demonstram, respectivamente, que o aumento do DOPAC em dialisados cerebrais não é acompanhado do correspondente aumento da dopamina e que a acumulação da dopamina e do DOPAC são semelhantes tanto em animais de controlo como nos animais tratados com um bloqueador da captação neuronial. Por outro lado, Racké e col. (1987)[196], numa preparação isolada do lobo intermediário da hipófise, demonstraram que, em condições basais de síntese da dopamina, uma considerável parte dos metabolitos da dopamina se originava de uma fracção da amina de formação recente.

Com o fim de estudar cinéticamente a formação de dopamina,

DOPAC e HVA e aprofundar a origem dos metabolitos da dopamina nalgumas áreas cerebrais de Rato (estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal), realizamos experiências de inibição da síntese da dopamina no passo limitante dessa síntese (inibição da hidroxílase da tirosina) e doseamento nos tecidos referidos da dopamina e dos seus metabolitos DOPAC e HVA. É de acentuar que, nesta série experimental, os doseamentos são feitos nos tecidos cerebrais seleccionados, não se tratando de experiências de superfusão com doseamentos no efluxo como sucedeu na 1ª série experimental.

Material e Métodos

Dissolveu-se o inibidor da hidroxílase da tirosina, a alfa-metil-p-tirosina levógira, numa pequena quantidade de 4 N NaOH e o pH da solução foi ajustado a pH 9 pela adição de 4 N HCl. Este preparado foi diluído em água destilada de forma a obter-se uma solução a 2%. Em três grupos de cinco ratos, injectou-se o inibidor da hidroxílase da tirosina por via intraperitoneal na dose de 200 mg/kg de peso. Para assegurar a adequada manutenção da inibição da síntese de dopamina, foi administrada uma segunda dose de alfa-metil-p-tirosina (100 mg/kg), pela mesma via, duas horas após a primeira administração. Ao grupo dos animais de controlo foi injectado por via intraperitoneal o solvente utilizado na preparação da alfa-metil-p-tirosina. Uma , duas e três horas após a segunda administração da alfa-metil-p-tirosina sacrificaram-se os animais por decapitação, os cérebros foram removidos e dissecados conforme descrito anteriormente.

Após a dissecção e pesagem, colocaram-se os tecidos em 500

μl de ácido perclórico na concentração de 0,1 mol/l, ao qual se juntaram 1250 pg de diidroxibenzilamina (padrão interno); os tecidos assim tratados foram imediatamente congelados a -30°C. Este procedimento permite a remoção completa de dopamina, DOPAC e HVA dos fragmentos de tecido cerebral. Após descongelação lenta, retiraram-se 100 μl do sobrenadante, agora contendo a dopamina e seus metabolitos extraídos dos tecidos; após filtração num microfiltro Millipore (MF1) 50 μl do fitrado foi injectado directamente na coluna do cromatógrafo.

As concentrações de dopamina, DOPAC e HVA nas áreas selecionadas foram determinadas em tempos diferentes da inibição da síntese com alfa-metil-p-tirosina (1, 2 e 3 horas). Para calcular a taxa de renovação da dopamina, DOPAC e HVA os conteúdos tecidulares da amina e metabolitos foram transformados logaritmicamente e correlacionados com o tempo de inibição da síntese. A inclinação das rectas de queda foi calculada por regressão linear. A taxa constante de queda da amina e dos seus metabolitos (k) foi determinada através da expressão, k=valor da inclinação/0,434 [35] e a taxa de renovação calculada multiplicando os valores basais pela constante de queda; o tempo de renovação era $1/k$.

Resultados

Nos animais de controlo determinaram-se os valores absolutos de dopamina, DOPAC e HVA nas três áreas cerebrais estudadas. Na tabela 1 indicam-se estes valores e o da relação DOPAC/DA. Embora o valor do DOPAC seja mais elevado no estriado do que

no *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal, a relação DOPAC/DA atingiu o valor máximo no córtex pré-frontal; por sua vez, esta relação era mais elevada no *accumbens* do que no estriado.

Tabela 1. Valores absolutos de dopamina (DA), DOPAC e HVA (ng/g) no estriado, accumbens e córtex pré-frontal e relação DOPAC/DA nos ratos de controlo. Os resultados são apresentados em média±EPM (n=5).

	estriado	accumbens	pré-frontal
Dopamina (DA)	9239,3±611,0	4184,9±374,0	129,0±10,4
DOPAC	1416,4±169,1	1071,4± 98,2	52,5± 8,0
HVA	580,4± 39,5	488,1± 63,4	17,2± 2,8
DOPAC/DA	1,5± 0,2	2,6± 0,2*	4,0± 0,4*

* significativamente diferente do valor correspondente do estriado (P<0,05)

Na figura 7 mostram-se as rectas de queda da dopamina, DOPAC e HVA após inibição da hidroxílase da tirosina, no estriado, *accumbens* e córtex pré-frontal. O declínio dos conteúdos tecidulares de dopamina, DOPAC e HVA no estriado e *accumbens* fez-se de forma exponencial. Não foi possível determinar as concentrações de DOPAC e HVA após inibição da síntese da dopamina no córtex pré-frontal (salvo o DOPAC nas amostras colhidas 1 hora após); no entanto, o declíneo da concentração tecidular da dopamina foi, também nesta estrutura, exponencial. A inclinação da recta de queda da dopamina foi mais marcada no córtex pré-frontal, menos marcada no estriado, ocupando uma posição intermédia no *nucleus accumbens*.

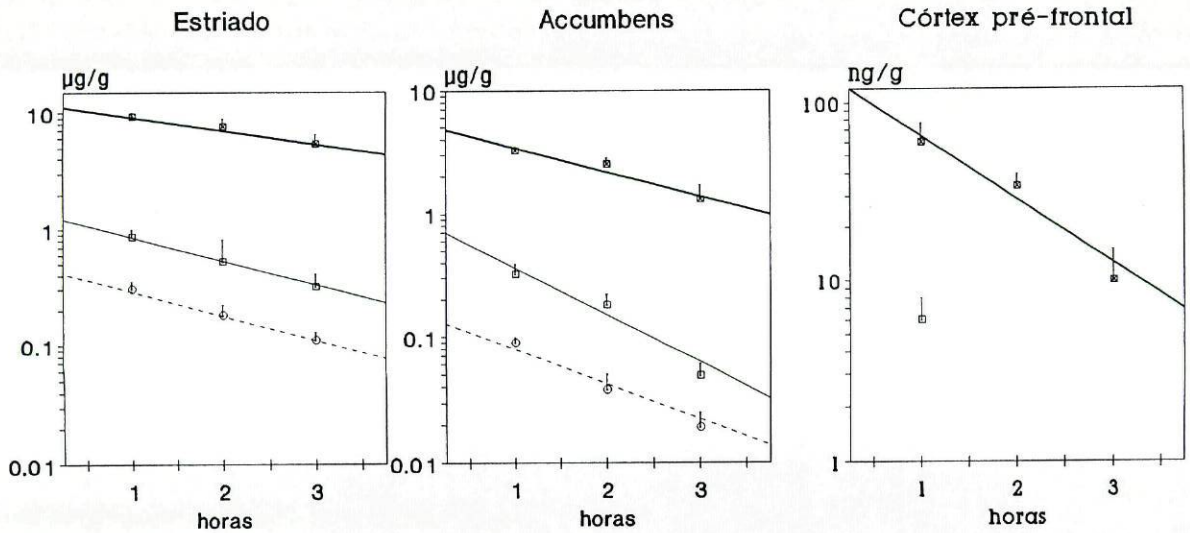


Figura 7. Níveis de dopamina (linha a cheio grossa; quadrados a cheio), DOPAC (linha a cheio fina; quadrados em aberto) e HVA (linha tracejada; círculos em aberto) no estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal de Rato em tempos diferentes após a administração de alfa-metil-p-tirosina (200 mg/kg i.p.). Os resultados exprimem a queda da dopamina, do DOPAC e do HVA; cada ponto representa a média ± EPM de cinco animais por grupo.

Os coeficientes de correlação linear são:

Estriado- dopamina, r=0,99, n-15; DOPAC, r=0,99, n=15 e HVA, r=0,99, n=15.

Accumbens- dopamina, r=0,96, n=15; DOPAC, r= 0,96, n=15 e HVA, r=0,99, n=15.

Córtex pré-frontal- dopamina, r=0,96, n=15.

Estes factos são também postos em evidência pela análise dos valores de *k*, como se pode observar na tabela 2.

Tabela 2. Taxa constante de queda, tempo de renovação e taxa de renovação de dopamina, DOPAC e HVA, determinados através da queda da amina e dos metabolitos após inibição da síntese com alfa-metil-paratirosina, no estriado, accumbens e córtex pré-frontal de Rato. Os resultados apresentados são médias ±EPM.

Tecido	Taxa constante de queda K(hora^{-1})	Tempo de renovação (horas)	Taxa de renovação (ng/g/h)
Estriado			
dopamina	0,212±0,027	4,9±0,5	1957±279
DOPAC	0,527±0,064**	2,0±0,3**	762±164**
HVA	0,488±0,046**	2,1±0,2**	285± 42**
Accumbens			
dopamina	0,455±0,043#	2,3±0,2#	1858± 73
DOPAC	1,031±0,.70**	1,0±0,1**	1109±149*
HVA	0,745±0,105*	1,4±0,2*	324± 57**
Pré-frontal			
dopamina	0,984±0,210#	1,1±0,2#	124± 19
DOPAC	----------	-----	-----
HVA	----------	-----	-----

Significativamente diferente do valor correspondente para a dopamina (* P<0,05,** P<0<01).
Significativamente diferente do valor da dopamina no estriado (# P<0,01).

A taxa constante de queda para a dopamina no estriado foi 0,212/hora, a qual representa metade da observada no *nucleus accumbens* (0,455/hora) e é quatro vezes menor da que ocorre no córtex pré-frontal (0,984/hora).

No estriado a taxa constante de queda do DOPAC foi duas vezes superior à da dopamina e praticamente igual à do HVA. O mesmo se observa no *nucleus accumbens*, i.e., tanto no estriado como no *nucleus accumbens* a taxa constante de queda do DOPAC foi superior à da dopamina (tabela 2). Por outro lado, tal como sucedeu com a dopamina, a inclinação das rectas de queda para o DOPAC e para o HVA foi mais acentuada no *nucleus accumbens* do que no estriado. No estriado a taxa constante de queda do DOPAC e HVA foi, respectivamente, de 0,527/hora e de 0,488/hora, valores cerca de metade dos observados no *nucleus accumbens*. Na tabela 2 estão igualmente indicados os valores da taxa de renovação e do tempo de renovação da dopamina, do DOPAC e do HVA após inibição da hidroxílase da tirosina. As diferenças observadas nestes parâmetros, nas três áreas cerebrais, seguem exactamente o mesmo padrão das referidas para os valores de k.

Discussão

O desaparecimento do DOPAC e do HVA nas três áreas cerebrais estudadas foi sempre mais rápido do que o desaparecimento da dopamina. Assumindo que a alfa-metil-p-tirosina não tem qualquer outra acção para além da inibição da hidroxílase da tirosina[35], os nossos resultados sugerem fortemente

que uma fracção considerável do DOPAC tem a sua origem em dopamina de síntese recente.

A metodologia clássica utilizada no estudo das taxas de metabolização de um determinado transmissor baseia-se na administração de um inibidor da via metabólica em estudo e na determinação da taxa constante de desaparecimento do metabolito em causa[171,172]. Contudo, este procedimento apenas dá indicação do ritmo do processo e da importância dessa via; não indica, porém, qual a extensão da metabolização do transmissor recém-sintetizado. Pelo contrário, a metodologia usada neste estudo (inibição da síntese da dopamina) permite obter essa informação através da quantificação da magnitude da via metabólica e calcular os parâmetros cinéticos que a definem.

Neste estudo, a alfa-metil-p-tirosina provocou uma redução evidente da quantidade absoluta da dopamina e seus metabolitos no estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal. A diminuição das concentrações tecidulares da amina foi dependente do tempo de inibição da hidroxílase da tirosina, observando-se uma redução monoexponencial das concentrações tecidulares de dopamina. Contudo, a taxa constante de queda da dopamina não foi idêntica nas três áreas cerebrais em estudo; foi superior no córtex pré-frontal e inferior no estriado.

Partindo do principio que a taxa constante de queda da dopamina resultante da inibição da alfa-metil-p-tirosina é igual à taxa de síntese, então esta será diferente nas três áreas cerebrais. Assim, a taxa de síntese será maior no córtex pré-frontal do que no *nucleus accumbens* e no estriado; por sua vez, será maior no *nucleus accumbens* do que no estriado. A taxa constante de queda reflecte

a taxa de síntese numa unidade neuronial, enquanto que a taxa de renovação, a qual é o produto de *k* pelo nível inicial de amina, indica a quantidade de amina que pode ser sintetizada numa determinada área; até certo ponto, a taxa de renovação poderá indicar a densidade de inervação. Sendo assim, será mais lógico aceitar a taxa constante de queda para exprimir a capacidade de síntese, quando se pretendem comparar taxas de síntese entre diferentes áreas.

O achado mais relevante destas experiências foi o de, em qualquer das três áreas cerebrais estudadas, o efeito da inibição da síntese da dopamina pela alfa-metil-p-tirosina se fazer sentir de forma mais marcada sobre os metabolitos desta do que sobre a própria amina que lhes dá origem. No córtex pré-frontal, onde a taxa de síntese da dopamina é superior à verificada no *nucleus accumbens* e no estriado, a administração de alfa-metil-p-tirosina reduziu os níveis do DOPAC e do HVA mesmo para valores abaixo do limite de detecção do método. Isto sugere, como referimos no início desta discussão, que a formação do DOPAC depende essencialmente de dopamina de síntese recente, isto é, que a dopamina recém sintetizada será em grande parte desaminada antes que possa ser armazenada num compartimento ao abrigo da MAO. De acordo com esta interpretação está o facto de a relação DOPAC/ dopamina tecidular ser mais elevada nas áreas com uma taxa de síntese mais intensa e os resultados referidos por Bannon e Roth (1983)[9] nos quais se mostra que a razão DOPAC/ dopamina é maior nas áreas com maior frequência de descarga .

Outros autores têm igualmente apresentado resultados

sugestivos de que o DOPAC é essencialmente formado a partir de dopamina recém-sintetizada[172,173,258]. Estes estudos mostram que a inibição da sintese de dopamina, no passo dependente da descarboxílase da diidroxifelinalanina (DOPA) com os compostos NSD 1015 e NSD 1034, resultou em redução dos níveis do DOPAC, sem modificação significativa dos níveis de dopamina. No estudo de Nissbrandt e col (1989)[174] refere-se que o bloqueio dos receptores da dopamina pelo haloperidol resulta num aumento do conteúdo tecidular de DOPA e DOPAC no estriado, sem alterar o teor de dopamina. Da mesma forma, a activação dos receptores da dopamina pela apomorfina resulta em redução importante do conteúdo tecidular do DOPAC sem que o contéudo em dopamina seja modificado. Mignot e Laude (1985)[159] estudaram no Rato a taxa de renovação da dopamina, DOPAC e HVA, monitorizando a queda da amina e dos seus metabolitos após inibição da hidroxílase da tirosina no estriado, região pré-frontal e LCR. Estes autores observaram que a taxa de formação da dopamina e metabolitos não é igual nestes três locais. Referem ainda que na região pré-frontal o declínio nas concentrações do DOPAC e HVA é superior ao da dopamina.

Verifica-se, pois, que também a maioria dos resultados referidos na literatura apontam para o facto de a alteração da síntese da dopamina afectar de forma mais marcada a formação do DOPAC e do HVA do que a da amina que lhes deu origem, o que está de acordo com os nossos próprios resultados, quer os agora apresentados, quer os referentes às experiências de libertação (1ª série experimental).

Em conclusão, uma vez que a inibição da síntese da amina tem mais influência na formação do DOPAC do que na da própria dopamina, os resultados apresentados mostram que no estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal de Rato o DOPAC tem a sua origem em dopamina recém-sintetizada.

3ª SÉRIE EXPERIMENTAL

Papel da monaminoxídase (MAO) de tipo A e B na formação do ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no tecido cerebral de Rato.

Dos estudos referentes às 1ª e 2ª séries experimentais concluímos que o DOPAC tem origem essencialmente em dopamina intraneuronial de formação recente e que nunca foi libertada do terminal dopaminérgico. Uma forma de comprovar uma vez mais que assim é consiste em ver como se modificam os níveis tecidulares de dopamina e de DOPAC quando se impede a desaminação da dopamina pela MAO. É o que fizemos nesta 3ª série experimental.

Estão descritos 2 tipos de MAO, o tipo A (MAO-A) e o tipo B (MAO-B). A distribuição destas duas formas de MAO está bem estudada no tecido cerebral de Rato; enquanto que a MAO-B quase não se encontra presente nos elementos neuroniais, a MAO-A tem uma distribuição intra- e extraneuronial[245]. Dado que a maior parte da MAO nos terminais neuroniais é de tipo A, se o DOPAC tecidular deriva essencialmente de uma fracção da dopamina de síntese recente e que nunca foi libertada, a inibição da MAO-B pouco efeito terá sobre os níveis do DOPAC tecidular. Pelo contrário, a inibição da MAO-A deverá reduzir a formação deste metabolito e elevar os níveis de dopamina nos tecidos.

Nesta série de experiências apresentam-se os resultados obtidos após a inibição não selectiva da MAO e a inibição selectiva da MAO-A e da MAO-B sobre os níveis tecidulares de dopamina e metabolitos no estriado, no *nucleus accumbens* e no córtex pré-

frontal de Rato.

Método experimental.

Para inibir simultaneamente a MAO-A e a MAO-B utilizou-se a pargilina (75 mg/kg, i.p.). A inibição selectiva da MAO-B foi realizada com a selegilina (5 mg/kg, i.p.) e a da MAO-A com a clorgilina (2 mg/kg, i.p.). Estes fármacos foram administrados por via intraperitonial a grupos de 5 ratos; os animais de controlo foram injectados com volume idêntico de soro cloretado isotónico, que contituiu o solvente daqueles inibidores da MAO. Sessenta minutos após a administração os animais foram sacrificados por decapitação. Em dois outros grupos, de cinco ratos cada, administrou-se clorgilina (2 mg/kg, também por via intraperitonial) e o sacrificio dos animais foi realizado mais cedo (aos 15 e aos 30 minutos).

Após a dissecção, a extracção da dopamina e metabolitos e a preparação da amostra a injectar no cromatógrafo obedeceram à metodologia descrita na 2ª série experimental.

Resultados

A administração de um inibidor selectivo da MAO-B, a selegilina, não alterou as concentrações tecidulares de dopamina, DOPAC e HVA nas três áreas cerebrais estudadas (figuras 8, 9 e 10). Pelo contrário, a administração de um inibidor não selectivo da MAO provocou uma marcada redução dos níveis tecidulares de DOPAC (90-97%) e HVA (89-92%) no estriado e no *nucleus accumbens*; este efeito sobre a formação dos metabolitos da

dopamina foi acompanhado de um aumento (34-95%) dos níveis tecidulares da amina (figura 8 e 9). Da mesma forma e nas mesmas condições experimentais, um inibidor selectivo da MAO-A, a clorgilina, condicionou uma redução dos níveis tecidulares do DOPAC (68 a 90%) e do HVA (72 a 83%) nas três áreas cerebrais em estudo (figuras 8, 9 e 10). Tal como se observou com a pargilina, a administração de clorgilina resultou em elevação dos níveis tecidulares da dopamina; este efeito foi mais marcado no córtex pré-frontal (52%) e no *nucleus accumbens* (39%) do que no estriado (25%).

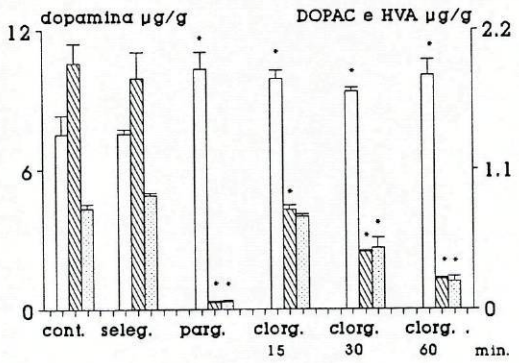


Figura 8. Efeito da pargilina (parg. 75mg/kg, i.p.), clorgilina (clorg. 2mg/kg, i.p.) e selegilina (seleg. 5mg/kg, i.p.) sobre os níveis de dopamina (barras em aberto), DOPAC (barras tracejadas) e HVA (barras ponteadas) no estriado de Rato. Nos ratos de controlo (cont.) administrou-se por via intraperitoneal uma solução salina (4ml/kg) e os tecidos retirados 60 minutos após a injecção ou 15, 30 e 60 minutos como indicado para a clorgilina. As barras representam média + EPM de cinco experiências.

* Significativamente diferente dos valores de controlo (método de Tukey-Kramer: $P<0,01$).

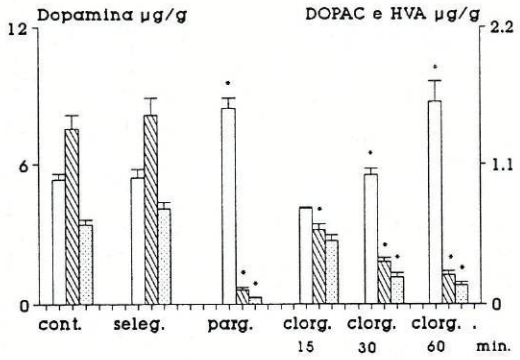


Figura 9. Efeito da pargilina (parg. 75mg/kg, i.p.), clorgilina (clorg. 2mg/kg, i.p.) e selegilina (seleg. 5mg/kg, i.p.) sobre os níveis de dopamina (barras em aberto), DOPAC (barras tracejadas) e HVA (barras ponteadas) no *nucleus accumbens* de Rato. Nos ratos de controlo (cont.) administrou-se por via intraperitoneal uma solução salina (4ml/kg) e os tecidos retirados 60 minutos após a injecção ou 15, 30 e 60 minutos como indicado para a clorgilina. As barras representam média + EPM de cinco experiências.

* Significativamente diferente dos valores de controlo (método de Tukey-Kramer: $P<0,01$).

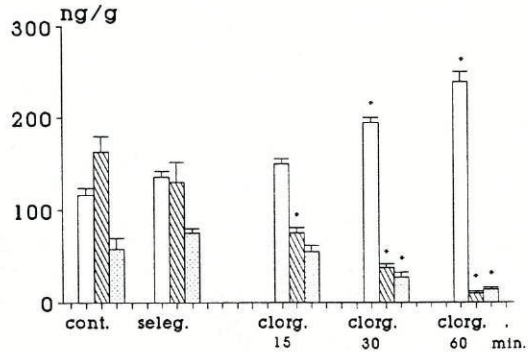


Figura 10. Efeito da clorgilina (clorg. 2mg/kg, i.p.) e da selegilina (seleg. 5mg/kg, i.p.) sobre os níveis de dopamina (barras em aberto), DOPAC (barras tracejadas) e HVA (barras ponteadas) no córtex pré-frontal de Rato. Nos Ratos de controlo (cont.) administrou-se por via intraperitoneal uma solução salina (4ml/kg) e os tecidos retirados 60 minutos após a injecção ou 15, 30 e 60 minutos como indicado para a clorgilina. As barras representam média + EPM de cinco experiências.

* Significativamente diferente dos valores de controlo (método de Tukey-Kramer: $P<0,01$).

Como nos foi possível determinar o efeito da clorgilina também aos 15 e 30 minutos e não apenas aos 60 minutos, após a administração do fármaco, pudemos verificar que o efeito deste inibidor depende do tempo em que a enzima está inibida (figuras 8, 9 e 10). É de acentuar que a queda do DOPAC, com o decorrer do tempo de inibição, foi mais marcada do que a do HVA nas três áreas cerebrais estudadas.

Discussão.

O objectivo destas experiências foi estudar o efeito da inibição selectiva da MAO-B ou da MAO-A e da inibição não selectiva, portanto simultânea, de ambos os tipos de MAO, sobre a desaminação da dopamina em três áreas cerebrais de Rato. Os resultados apresentados mostram que só a inibição da MAO-A, quer não selectiva pela pargilina, quer selectiva pela clorgilina, reduz a desaminação da dopamina: os níveis da dopamina aumentam e os dos metabolitos diminuem. A inibição selectiva da MAO-B pela selegilina não teve qualquer efeito sobre a desaminação da dopamina em qualquer um dos tecidos estudados.

Estes resultados estão de acordo com observações prévias, referidas por vários autores, mostrando que a inibição da MAO-A resulta em aumento dos níveis tecidulares da dopamina no estriado, enquanto que a inibição da MAO-B não condiciona modificação das concentrações tecidulares da amina[6,109,122,176,179,180,246]. A ausência de efeito da selegilina sobre a desaminação da dopamina não resulta da utilização de uma dose insuficiente. Na verdade, Waldmeier e col.

(1976)[246] mostraram, no tecido cerebral de Rato, que 0,3 e 3,0 mg/kg de selegilina reduziram respectivamente de 65% e de 75% a desaminação da ß-feniletilamina, que é substrato específico da MAO-B. Kato e col (1986)[122], usando doses duas vezes superiores às utilizadas no presente estudo, não verificaram qualquer alteração nos níveis tecidulares de dopamina, DOPAC e HVA no estriado. Portanto, tudo parece indicar que a falta de eficácia da selegilina está relacionada com o facto de a dopamina ser desaminada em DOPAC intraneuronialmente, local onde a actividade da MAO é essencialmente de tipo A. De acordo com esta interpretação estão os resultados apresentados por Oreland e col (1983)[180]; estes autores demonstraram que no estriado de rato 84% da desaminação da dopamina era dependente da actividade da MAO-A e ocorria dentro dos sinaptossomas , 11% era desaminada fora dos sinaptossomas pela MAO-A e apenas 5% estava dependente da actividade da MAO-B (2% dentro e 3% fora destas estruturas). Os estudos de Offori e col (1986)[179] e de Nguyen e Angers (1987)[176] favarecem também a noção de que a maior parte da dopamina recém-sintetizada é desaminada essencialmente pela MAO-A. Estes autores mostraram que a administração de dihidroxifenilalanina (l- dopa) leva a um aumento dos níveis estriatais da dopamina e este efeito vem potenciado pela administração prévia de um inibidor da MAO-A (clorgilina), mas não pela administração prévia de um inibidor da MAO-B (selegilina).

No que se refere ao HVA, tem sido referido por outros autores que a diminuição das concentrações tecidulares do DOPAC, após inibição da MAO-A, é mais rápida do que a redução das concentrações de HVA[70,218,254,257]. Na 2ª série experimental também se

observa que a taxa de queda do HVA e ligeiramente menor da do DOPAC (tabela 2). Este facto está de acordo com o conceito de que uma fracção considerável do HVA tem origem em DOPAC formado antes da inibição da MAO ter tido lugar. Em todos os estudos que referimos, retirados da literatura, a inibição da MAO foi obtida com inibidores não selectivos; no entanto, no presente estudo o mesmo se verificou com a utilização de um inibidor selectivo da MAO-A, a clorgilina. Por nossa parte, também observamos que a queda do DOPAC, com o decorrer do tempo de inibição, foi mais marcada do que a do HVA nas três áreas cerebrais estudadas.

Os nossos resultados confirmam os préviamente obtidos no estriado pelos referidos autores e mostram que o mesmo sucede no *nucleus accumbens* e no córtex pré-frontal: a dopamina é, nestes tecidos, essencialmente desaminada pela MAO-A, não tendo a MAO-B papel significativo no metabolismo da amina. Estes resultados harmonizam-se bem com os obtidos na 1ª e 2ª séries de experiências, anteriormente descritas.

Em conclusão, os resultados apresentados demonstram que no estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal a desaminação da dopamina se faz, pelo menos na sua maior parte, pela MAO-A a nível intraneuronial.

4ª SÉRIE EXPERIMENTAL

Efeito da inibição da hidroxílase do triptofano e da monoaminoxídase de tipo A sobre os níveis da 5-hidroxitriptamina e do ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) no cérebro de Rato: implicações sobre a origem do 5-HIAA

No cérebro a 5-hidroxitriptamina é sintetizada a partir do triptofano. Este é primeiro hidroxilado pela hidroxílase do triptofano em 5-hidroxitriptofano, o qual é rapidamente descarboxilado, pela descarboxílase (não selectiva) dos ácidos aminados aromáticos levógiros, em 5-hidroxitriptamina. O armazenamento da amina em vesículas faz-se por um processo idêntico ao observado para as outras monaminas (noradrenalina, dopamina etc.). A hidroxilação do triptofano pela respectiva hidroxílase é o passo limitante da síntese da 5-hidroxitriptamina, pelo que é esta hidroxílase que deve ser inibida, quando para fins experimentais se pretende inibir a síntese da 5-hidroxitriptamina. Por sua vez a metabolização da 5-hidroxitriptamina inicia-se com a desaminação oxidativa pela MAO, que a transforma em 5-hidroxiindolacetaldeído; este composto é rapidamente tranformado, pela desidrogénase aldeídica, em ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Uma pequena fracção, (cerca de 1%) do 5-hidroxiindolacetaldeído sofre redução pela desidrogénase alcoólica, formando-se pequeníssimas quantidades de 5-hidroxitriptofol. O passo limitante da metabolização da 5-hidroxitriptamina é precisamente o primeiro, isto é, a desaminação oxidativa da amina pela MAO, pelo que é esta a enzima que se deve inibir quando se pretende impedir a metabolização da

5-hidroxitriptamina e, consequentemente, a formação do seu metabolito principal, o 5-HIAA.

Porque existe dificuldade em quantificar-se a libertação da 5-hidroxitriptamina durante a activação neuronial [65,86,111,144,159,212], a determinação do 5-HIAA no tecido cerebral, líquido cefaloraquidiano e dialisados cerebrais é genericamente utilizado como uma medida indirecta da actividade dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos. Contudo o uso deste indicador como medida indirecta da transmissão 5-hidroxitriptaminérgica é passível de críticas, pois os níveis de 5-HIAA podem reflectir diferentes processos neuroquímicos[199,261].

Embora a alteração do sistema 5-hidroxitriptaminérgico central na doença de Huntington seja ainda um problema controverso, como já referido na introdução [25,48,64,94,126,135,201], importa saber como devemos valorizar os trabalhos que utilizam o 5-HIAA para medir indirectamente a actividade daquele sistema, isto é, para apreciar quantitativamente a libertação de 5-hidroxitriptamina. No entanto, como sucede para o DOPAC em relação à dopamina, a utilização do 5-HIAA com a referida finalidade só pode ser válida assumindo que: (1) a libertação da amina ocorre através de um processo exocitótico e (2) a desaminação da amina ocorre apenas após a sua libertação, o que implica não haver desaminação intraneuronial significativa da amina recentemente sintetizada.

Embora, geralmente, se aceite que a libertação da amina se faz através de um processo exocitótico[211], não há razões para pôr de lado a hipótese de que uma parte significativa de

5-hidroxitriptamina seja desaminada antes de ser armazenada nas vesículas. De facto, o passo inicial da metabolização da 5-hidroxitriptamina, isto é, a desaminação pela MAO, ocorre no citoplasma.

Para verificar se uma parte significativa da 5-hidroxitriptamina recém-sintetizada é ou não desaminada no citoplasma neuronial, antes de armazenada nas vesículas, realizamos dois tipos de experiências:

1-Inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina, por inibição da hidroxílase do triptofano, e o seu efeito sobre as taxas de perda da 5-hidroxitriptamina e do 5-HIAA em diversas áreas cerebrais de Rato conhecidas por conterem uma população considerável de neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos (córtex pré-frontal, córtex parietal, estriado, *nucleus accumbens* e tronco cerebral). Estas experiências permitem-nos obter informação a propósito da quantidade de 5-hidroxitriptamina recém-sintetizada que seja desaminada antes do seu armazenamento nas vesículas. Também, por doseamento das catecolaminas e dos seus metabolitos, podemos verificar se teor das aminas e seus metabolitos são ou não modificados pela inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina.

2-Inibição da metabolização da 5-hidroxitriptamina (substracto específico da MAO-A), por inibição da MAO-A, e o seu

efeito sobre a taxa de acumulação da 5-hidroxitriptamina e da taxa de declínio do 5-HIAA, nas áreas cerebrais referidas.

Material e Métodos

O bloqueio da síntese da 5-hidroxitriptamina por inibição da hidroxílase do triptofano foi realizado pelo 6-fluortriptofano (6-FT), um inibidor da enzima ainda mais potente do que a p-clorofenilalanina[155,164,189]. O 6-FT foi dissolvido numa pequena quantidade de NaOH 0.5M e o pH da solução ajustado a 9 com tampão de fosfato 1M (pH 7). A solução foi diluida em água destilada para se obter uma solução a 5% antes de ser injectada em 3 grupos de 5 ratos, na dose de 100 mg/kg de peso de 6-FT. O mesmo volume do solvente utilizado na preparação do 6-FT foi injectado por via intraperitoneal nos animais de controlo. Trinta, 60 e 90 minutos após a administração de 6-FT, os ratos foram decapitados, os cérebros removidos e dissecados, como se descreveu anteriormente.

A inibição da MAO-A foi realizada através da injecção, por via intraperitonial, de clorgilina, na dose de 2 mg/kg de peso, em três grupos de cinco ratos, seguindo o mesmo protocolo descrito na 3ª série experimental. Quinze, 30 e 60 minutos após a administração de clorgilina os ratos foram sacrificados por decapitação, os cérebros removidos e dissecados, como já foi antes descrito.

O método de extração da amina e dos metabolitos dos tecidos

e a preparação das amostras a injectar no cromatógrafo foi idêntico ao usado nas 2ª e 3ª séries experimentais. Do mesmo modo, os parâmetros cinéticos determinados foram calculados de forma idêntica ao descrito na 2ª série experimental.

Resultados

1- Inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina

Como se pode observar na tabela 3, as concentrações tecidulares de dopamina, noradrenalina e respectivos metabolitos (DOPAC, HVA, 3-MT e MHPG) não foram significativamente alterados pela administração de 6-FT.

Na figura 11 estão representadas as rectas de queda, em escala semilogarítmica, da 5-hidroxitriptamina e do 5-HIAA, após inibição da hidroxílase do triptofano pelo 6-FT, nas cinco áreas cerebrais estudadas. Em todas elas a perda da 5-hidroxitriptamina e do 5-HIAA, após inibição da síntese pelo 6-FT, foi rápida e monoexponencial. Contudo, a perda do 5-HIAA foi mais rápida do que a da amina em todas as áreas cerebrais, com excepção do tronco cerebral. Esta área cerebral corresponde ao local de origem dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos, onde a redução das concentrações tecidulares da amina foi maior ($P < 0,01$) do que a do seu metabolito.

Tabela 3. Níveis de dopamina (DA) e noradrenalina (NA) e respectivos metabolitos em diversas áreas cerebrais dos ratos de controlo em ng/g **(A)** e percentagem de variação 90 minutos após a administração de 6-FT (100 mg/kg, i.p.)**(B)**; os resultados são apresentados em média±EPM (n=5).

Córtex pré-frontal	A (ng/g)	B (%)
DA	80± 9	1,2±0,1
DOPAC	123± 10	12,3±1,4
HVA	43± 4	10,6±0,9
3-MT	14± 32	4,5±0,6
NA	208± 32	2,4±0,3
MHPG	50± 6	15,3±1,7
Córtex parietal		
DA	12± 1	0,9±0,1
DOPAC	n.d.	-------
HVA	43± 4	6,7±0,9
3-MT	n.d.	-------
NA	123± 6	3,1±0,4
MHPG	41± 5	10,4±1,2
Estriado		
DA	10497±689	1,4±0,2
DOPAC	1844±202	7,1±0,6
HVA	693± 73	6,9±0,8
3-MT	686± 82	2,3±0,2
NA	109± 12	2,4±0,3
MHPG	39± 4	10,5±1,2
Nucleus accumbens		
DA	5740±489	1,8±0,2
DOPAC	1462±141	6,5±0,5
HVA	463± 47	6,2±0,5
3-MT	204± 22	2,3±0,2
MHPG	110± 9	6,8±0,9
Tronco cerebral		
DA	63± 4	2,3±0,2
DOPAC	42± 3	8,3±0,5
HVA	23± 2	9,5±0,7
3-MT	n.d.	-------
NA	420± 31	2,6±0,4
MHPG	120± 13	8,5±0,7

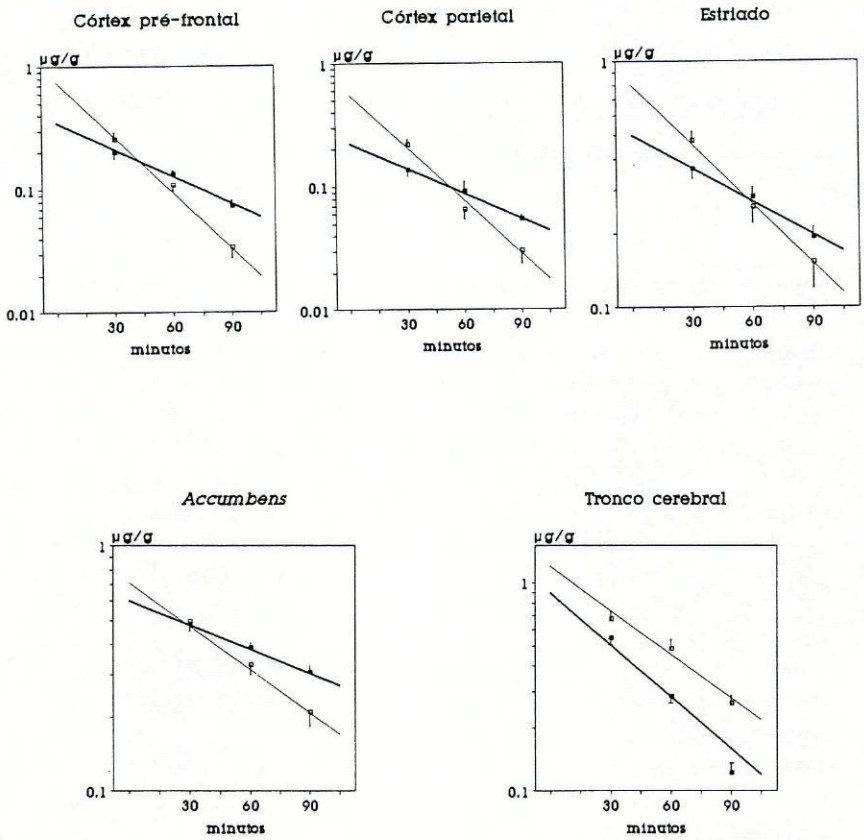


Figura 11. Níveis de 5-hidroxitriptamina (símbolos a cheio; linha a cheio grossa) e de 5-HIAA (símbolos em aberto; linha a cheio fina) no córtex frontal, córtex parietal, estriado, *nucleus accumbens* e tronco cerebral de Rato, em tempos diferentes após a administração de 6-FT (100mg/kg, i.p.). Os resultados mostram rectas de queda da 5-hidroxitriptamina e do 5-HIAA. Cada ponto representa a média ± EPM de cinco animais por grupo. Os coeficiente de correlação são:

Córtex frontal, 5-hidroxitriptamina, r=-0,994, n=15; 5-HIAA, r=-0,996, n=15.

Córtex parietal, 5-hidroxitriptamina, r=-0,997, n=15; 5-HIAA, r=-0,998, n=15.

Estriado, 5-hidroxitriptamina, r=-0,998, n=15; 5-HIAA, r=-0,999, n=15.

Nucleus accumbens, 5-hidroxitriptamina, r=-0,999, n=15; 5-HIAA, r=-0,999, n=15.

Tronco cerebral, 5-hidroxitriptamina, r=-0,997, n=15; 5-HIAA, r=-0,986, n=15.

Como se pode observar na tabela 4, a taxa constante de perda da 5-hidroxitriptamina em todas as áreas cerebrais estudadas, com excepção do tronco cerebral, é significativamente inferior à taxa constante de perda do 5-HIAA.

Tabela 4. Taxas constante de queda, tempo de renovação e taxa de renovação da 5-hidroxitriptamina (5-HT) e do 5-HIAA em diferentes áreas do cérebro de Rato determinados através do declínio das concentrações da amina e do seu metabolito após inibição da síntese com 6-FT (100 mg/kg i.p.). Os resultados são apresentados em médias ± EPM; n, número de animais utilizado.

tecido	níveis iniciais (ng/g)	(n)	taxa constante de perda K (hora-1)	tempo de renovação (horas)	taxa de renovação (ng/g/h)	(n)
<u>córtex pré-frontal</u>						
5-HT	392±24	(5)	0,996±0,094	1,0±0,1	391± 15	(15)
5-HIAA	221±32	(5)	2,008±0,109*	0,5±0,05	444± 23	(15)
<u>córtex parietal</u>						
5-HT	204±20	(5)	0,923±0,087	1,1±0,08	189± 16	(15)
5-HIAA	175±20	(5)	1,990±0,153*	0,5±0,04*	348± 29*	(15)
<u>estriado</u>						
5-HT	419±22	(5)	0,632±0,052	1,6±0,2	264± 28	(15)
5-HIAA	493±43	(5)	1,127±0,103*	0,9±0,08*	556± 47*	(15)
<u>accumbens</u>						
5-HT	741±58	(5)	0,455±0,043	2,2±0,2	337± 28	(15)
5-HIAA	584±62	(5)	0,859±0,058*	1,2±0.08*	502± 36*	(15)
<u>tronco cerebral</u>						
5-HT	804±78	(5)	1,499±0,024	0.7±0,1	205±124	(15)
5-HIAA	654±43	(5)	0,935±0,091*	1,1±0,2	611± 58*	(15)

* significativamente diferente dos valores correspondentes de 5-HT ($P<0,01$) usando o teste "t" de Student para dados não emparelhados.

No córtex pré-frontal, córtex parietal, estriado e *nucleus accumbens*, a taxa constante de perda do 5-HIAA foi 2 vezes superior à da 5-hidroxitriptamina. Nas áreas cerebrais estudadas, as taxas constantes de perda de 5-hidroxitriptamina após 6-FT variam conforme a área considerada; por ordem decrescente: tronco cerebral > córtex pré-frontal > córtex parietal > estriado > *nucleus accumbens*.

2- Inibição da metabolização da 5-hidroxitriptamina

Na figura 12 estão representadas as rectas de acumulação da 5-hidroxitriptamina e de perda do 5-HIAA, em escala semilogarítmica, após inibição da MAO-A nas já referidas áreas do SNC.

A administração de clorgilina provocou uma redução rápida e monoexponencial das concentrações tecidulares de 5-HIAA e um aumento monoexponencial das concentrações tecidulares de 5-hidroxitriptamina em todos os tecidos estudados.

No entanto, como se pode observar na tabela 5, a taxa constante de perda do 5-HIAA foi maior do que a taxa de acumulação de 5-hidroxitriptamina em todas as áreas cerebrais estudadas. No *nucleus accumbens*, estriado e tronco cerebral a taxa constante de perda do 5-HIAA após a administração de clorgilina foi semelhante à obtida por inibição da hidroxílase do triptofano pelo 6-FT. Contrastando com estes resultados, no córtex pré-frontal e córtex parietal a taxa constante de perda do 5-HIAA após administração de clorgilina foi, respectivamente, 2 e 3 vezes inferior à obtida pela administração de 6-FT.

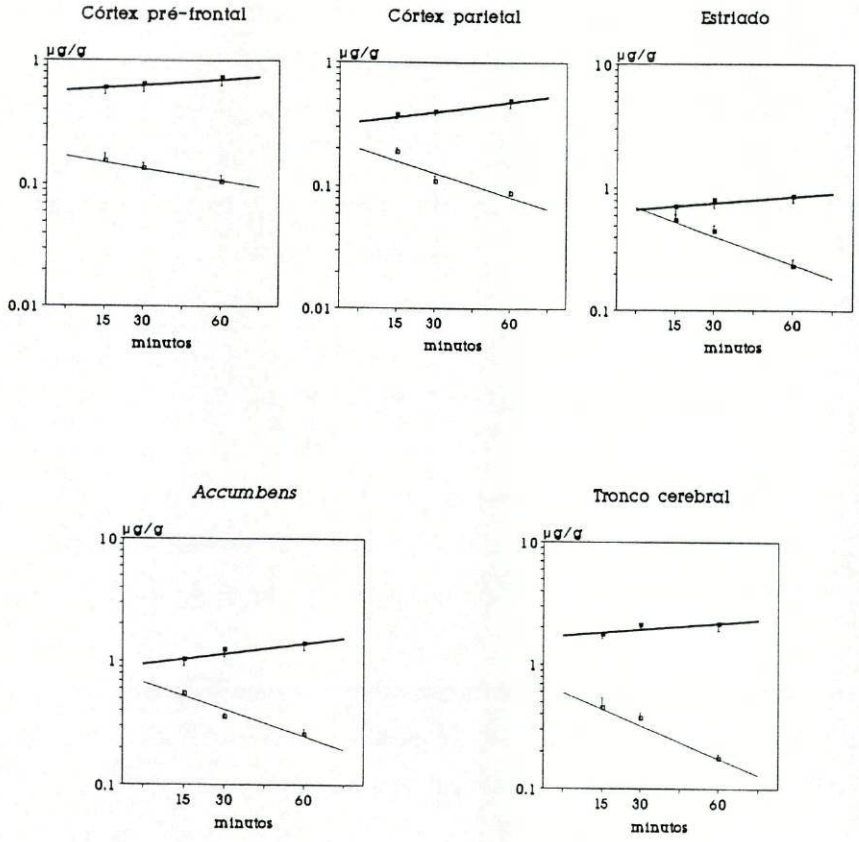


Figura 12. Níveis de 5-hidroxitriptamina (símbolos a cheio; linha a cheio grossa) e de 5-HIAA (símbolos em aberto; linha a cheio fina) no córtex frontal, córtex parietal, estriado, *nucleus accumbens* e tronco cerebral de Rato, em tempos diferentes após a administração de clorgilina (2mg/kg, i.p.). Os resultados mostram a recta de acumulação da 5-hidroxitriptamina e de queda do 5-HIAA, Cada ponto representa a média ± EPM de cinco animais por grupo. Os coeficiente de correlação são:

Córtex frontal, 5-hidroxitriptamina, r=0,999, n=15; 5-HIAA, r=-0,999, n=15.

Córtex parietal, 5-hidroxitriptamina, r=0,994, n=15; 5-HIAA, r=-0,911, n=15.

Nucleus accumbens, 5-hidroxitriptamina, r=0,951, n=15; 5-HIAA, r=-0,961, n=15.

Estriado, 5-hidroxitriptamina, r=0,951, n=15; 5-HIAA, r=-0,993, n=15.

Tronco cerebral, 5-hidroxitriptamina, r=0,824, n=15; 5-HIAA, r=-0,990, n=15.

Tabela 5. Taxa constante de queda, tempo de renovação e taxa de renovação da 5-hidroxitriptamina (5-HT) e do 5-HIAA em diferentes áreas do cérebro de Rato, determinados através da acumulação da amina e do declínio das concentrações do 5-HIAA após inibição da MAO-A pela clorgilina (2 mg/kg i.p.). Os resultados são apresentados em médias ±EPM; n, número de animais utilizado.

tecido	níveis iniciais (ng/g) (n)	taxa constante de acumulação e de perda K (hora + ou -1)	tempo de renovação (horas)	taxa de renovação (ng/g/h) (n)
<u>córtex pré-frontal</u>				
5-HT	413± 14 (5)	0,241±0,023	4,2±0,4	97± 9 (15)
5-HIAA	165± 13 (5)	0,509±0,061	2,0±0,2	84± 9 (15)
<u>córtex parietal</u>				
5-HT	344± 40 (5)	0,363±0,037	2,8±0,3	125± 14 (15)
5-HIAA	210± 19 (5)	0,936±0,083	1,1±0,09	196± 12 (15)
<u>estriado</u>				
5-HT	687± 72 (5)	0,238±0,032	4,2±0,3	164± 18 (15)
5-HIAA	636± 38 (5)	1,187±0,114	0,8±0,06	556± 47 (15)
<u>accumbens</u>				
5-HT	936±138 (5)	0,383±0,032	2,6±0,3	358± 24 (15)
5-HIAA	639± 84 (5)	0,965±0,087	1,0±0.2	617± 47* (15)
<u>tronco cerebral</u>				
5-HT	1544±158 (5)	0,243±0,013	4,1±0,3	375±38 (15)
5-HIAA	435± 52 (5)	1,289±0,118	0,8±0,05	562±59 (15)

Discussão.

O 6-FT não alterou as concentrações tecidulares de dopamina, noradrenalina e respectivos metabolitos o que põe em evidência a selectividade do efeito inibitório sobre a hidroxílase do triptofano, que se consegue sem alteração do metabolismo da dopamina ou da

noradrenalina. Miwa e col. (1987)[164] também mostraram, no cérebro inteiro de Rato, a selectividade do 6-FT sobre a inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina e a não alteração das concentrações de dopamina e noradrenalina.

No nosso estudo a inibição da hidroxílase do triptofano resultou numa efectiva redução das concentrações tecidulares da 5-hidroxitriptamina no córtex pré-frontal, córtex parietal, estriado, *nucleus accumbens* e tronco cerebral. A redução das concentrações tecidulares dependeu do tempo de inibição e seguiu um padrão monoexponencial de perda. Contudo, a taxa constante de perda da 5-hidroxitriptamina foi diferente nas cinco áreas cerebrais em estudo, maior no tronco cerebral e menor no *nucleus accumbens*. Conforme já foi discutido na 2ª série experimental, a metodologia que utiliza inibição da síntese de uma amina biogénica permite obter indicação sobre o ritmo do processo e da importância dessa via, tal como a metodologia que utiliza a inibição de uma determinada via catabólica indica ainda a extensão da metabolização do transmissor recém-sintetizado. Assumindo que a taxa constante de queda após inibição da hidroxílase do triptofano reflecte a taxa de síntese da amina, os resultados apresentados indicam que a menor taxa de síntese da 5-hidroxitriptamina ocorre no *nucleus accumbens*, seguindo-se por ordem crescente a do estriado, córtex parietal, córtex pré-frontal e tronco cerebral. De notar que a síntese mais intensa se observa no tronco cerebral, onde se originam os neurónios 5-hidroxitriptaminérgico.

Este resultado confirma observações prévias[156,171], em que se evidencia o facto de a taxa de renovação da 5-hidroxitriptamina ser

maior nos corpos celulares do que nos respectivos terminais neuroniais. Facto semelhante acontece com as vias dopaminérgicas. Nissbrandt e Carlsson (1987)[172] e Nissbrandt e col. (1989)[174] mostraram, num estudo comparativo do ritmo de síntese da dopamina, que a taxa de formação da dopamina na substância negra, local de origem dos neurónios dopaminérgicos, era duas vezes superior á observada no estriado. Contudo, poderia suceder, nas nossas experiências, que as diferentes taxas de perda obtidas após administração do 6-FT se relacionassem com o facto da hidroxílase do triptofano não ser inibida com igual intensidade em todas as áreas cerebrais estudadas. Porém, o facto de, no presente estudo, o efeito inibitório do 6-FT ser mais pronunciado na área que contém os núcleos do rafe (tronco cerebral), onde a hidroxílase do triptofano apresenta maior actividade, torna esta hipótese pouco plausível. Por outro lado, a conclusão de que o ritmo de formação da 5-hidroxitriptamina é diferente em diversas áreas cerebrais é extensível a outros neurotransmissores. Nós próprios verificamos, por exemplo, na 2ª série experimental, que a taxa de formação da dopamina era diferente no estriado, *accumbens* e córtex pré-frontal.

Contudo, o resultado mais relevante, nesta parte das nossas investigações, foi o de a taxa de perda da 5-HIAA ser maior do que a da 5-hidroxiptripatamina em todas as áreas cerebrais estudadas, com excepção do tronco cerebral. Tendo verificado que o 6-FT não altera as concentrações tecidulares de dopamina, noradrenalina e respectivos metabolitos e assumindo que o 6-FT não tem qualquer outra acção para além da inibição da hidroxílase do triptofano, os nossos resultados sugerem fortemente que uma fracção considerável

de 5-hidroxitriptamina recém-sintetizada é desaminada em 5-HIAA. Resultados semelhantes já se tinham observado com a dopamina (ver 2ª série experimental) e encontram-se referidos na literatura em relação á noradrenalina[101].

A excepção a este comportamento ocorre com a 5-hidroxitriptamina no tronco cerebral; de facto, nesta área, a taxa constante de queda da 5-hidroxitriptamina foi maior de que a do 5-HIAA, o que contrasta com os resultados obtidos nas outras áreas cerebrais. Este resultado parace indicar que nesta área a 5-hidroxitriptamina recém-formada é desaminada em 5-HIAA em menor extensão. Na verdade, a razão para este diferente comportamento pode ter a ver com os mecanismos de armazemamento e/ou libertação da 5-hidroxitriptamina no tronco cerebral. Dois tipos de resultados podem sugerir que no tronco cerebral os neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos possuem maior capacidade de armazenamento. Por um lado, observa-se que a taxa de síntese de 5-hidroxitriptamina é maior no tronco cerebral; ora é exactamente esta área, com maior capacidade de formação, aquela onde o efeito da clorgilina é mais marcado. Por outro lado, o facto de a taxa constante de declínio do 5-HIAA no tronco cerebral após inibição da desaminação com a clorgilina ser maior no tronco cerebral do que nas outras áreas cerebrais estudadas sugere que o menor ritmo de perda de 5-HIAA após 6-FT em comparação com as outras áreas cerebrais não se deve a uma menor actividade da MAO.

A sugestão de que o 5-HIAA cerebral é um indicador fiel da libertação da 5-hidroxitriptamina não é compatível, dentro de certos limites, com a evidência de que uma fracção considerável da

5-hidroxitriptamina recém-sintetizada é rapidamente desaminada em 5-HIAA. De facto, este achado favorece o ponto de vista de que os níveis cerebrais de 5-HIAA seriam um melhor indicador de síntese da 5-hidroxitriptamina do que da sua libertação.

Nos últimos anos tem sido referido por diversos autores em experiências realizadas *in vivo*, usando técnicas de diálise cerebral, que os estímulos que promovem a libertação de 5-hidroxitriptamina não se acompanham de aumento de 5-HIAA nos dialisados[116,184,217]. Kalén e col. (1988)[116] mostraram ainda que a perfusão com um meio enriquecido em potássio promove a libertação de 5-hidroxitriptamina e que os níveis de 5-HIAA diminuem no dialisado. Da mesma forma, Pei e col. (1989)[184] mostraram que a libertação da 5-hidroxitriptamina induzida pela picrotoxina no hipocampo se acompanha de redução do 5-HIAA. Estes resultados sugerem que a maior parte do 5-HIAA nos dialisados cerebrais não se origina em 5-hidroxitriptamina recém-libertada e que parte da 5-hidroxitriptamina libertada escapa à desaminação em 5-HIAA. Outro tipo de evidência que apoia o conceito de que uma parte considerável de 5-HIAA tem origem em 5-hidroxitriptamina recém-sintetizada e não libertada baseia-se no facto de o bloqueio da captação neuronial da amina não reduzir significativamente as concentrações de 5-HIAA nos dialisados cerebrais[116,184,217].

Miwa e col.(1987)[164] observaram, no cérebro inteiro de Rato, após tratamento dos animais com 6-FT, uma redução monoexponencial de 5-hidroxitriptamina não acompanhada de redução das concentrações de 5-HIAA. Estes resultados contrastam com os aqui apresentados e são dificeis de explicar pois têm sido

referidas reduções de 5-hidroxitriptamina e 5-HIAA após inibição da hidroxílase do triptofano com p-clorofenilalanina[86,129,144,212] ou após a inibição da descarboxílase dos ácidos aminados aromáticos levógiros[65,160].

No presente estudo observou-se que apenas no córtex pré-frontal e parietal o ritmo de perda de 5-HIAA foi menor após inibição com a clorgilina do que com a 6-FT; este facto parece indicar uma maior actividade da MAO nestas áreas corticais, tal como já sugerido nos resultados da 2ª e 3ª séries experimentais para o córtex pré-frontal. Por outro lado, a taxa de acumulação da 5-hidroxitriptamina após inibição da MAO-A era menor do que a taxa de perda após inibição da hidroxílase do triptofano em todas as áreas cerebrais estudadas. Uma explicação possível para esta discrepância poderá estar no facto de a quantidade de amina não metabolizada exceder a capacidade de armazenamento dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos e ser transportada para fora do compartimento neuronial[109], à semelhança do sugerido por Racké e col. (1987)[196] para a dopamina.

Os resultados referidos nesta secção mostram que os níveis de 5-HIAA reflectem, à semelhança dos do DOPAC, o metabolismo intraneuronial pré-sináptico da 5-hidroxitriptamina antes da sua libertação.

Em conclusão: uma fracção considerável de 5-hidroxitriptamina recém-formada é desaminada antes de ser libertada, pelo que os níveis cerebrais de 5-HIAA não devem ser utilizados como indicadores de libertação de 5-hidroxitriptamina.

Resumo e conclusões

Uma das abordagens mais utilizadas no estudo neuroquímico do sistema nervoso central baseia-se na determinação das concentrações dos neurotransmissores no tecido cerebral, no LCR e, recentemente, no animal, em dialisados cerebrais.

As concentrações de DOPAC e de HVA são geralmente utilizadas como indicadores da libertação de dopamina e as concentrações de 5-HIAA como indicadores da libertação de 5-hidroxitriptamina. No entanto, têm-se acumulado nos últimos anos sérias objecções a tal utilização. Na verdade, para que os referidos metabolitos possam ser fiéis indicadores da libertação das aminas que lhes dão origem será necessário ter a certeza de que eles se formam, exclusivamente ou quase, a partir das aminas previamente libertadas. Ora é precisamente esta assunção, classicamente estabelecida e até há pouco geralmente aceite sem críticas, que tem sido recentemente posta em causa.

Nestas circunstâncias, tendo em mente a implicação do sistema dopaminérgico e possivelmente também a do sistema 5-hidroxitriptaminérgico na doença de Huntington, como foi referido no introdução a esta dissertação, procuramos realizar experiências que, a par de outras informações importantes, nos pudessem elucidar acerca da proveniência da dopamina e da 5-hidroxitriptamina que constitui a fonte, respectivamente, do DOPAC e do 5-HIAA em certas áreas do SNC.

As experiências foram realizadas *in vitro* e *in vivo,* utilizando todas ou algumas das seguintes áreas cerebrais de Rato: estriado,

nucleus accumbens, córtex pré-frontal, córtex parietal e tronco cerebral.

Experiências de superfusão, com determinação da dopamina e do DOPAC no efluente

As experiências incidiram sobre o estriado e o *accumbens* (algumas vezes só sobre o estriado). Estudou-se a perda espontânea e a libertação por exocitose (estimulação eléctrica ou despolarização pelo potássio) e por um mecanismo não exocitótico (activação de um transportador transmembranoso). Nalgumas experiências procurou-se intensificar a libertação por meio do bloqueio dos receptores dopaminérgicos pré-sinápticos pelo sulpiride e noutras promoveu-se a redução da libertação de dopamina estimulando os referidos receptores pelo quinpirole. O efeito do bloqueio da captação neuronial pela cocaína ou pelo GBR12909 foi também investigado.

1-Perda espontânea

Em condições basais, verifica-se que:

- o efluxo DOPAC é maior no *nucleus accumbens* do que no estriado;
- a perda espontânea de DOPAC é muito maior do que a da dopamina, tanto no estriado como no *accumbens*;
- a perda espontânea após o bloqueio da captação neuronial se traduz por um aumento muito moderado de dopamina no

efluente sem alteração significativa, salvo ocasionalmente, do efluxo de DOPAC.

2-Libertação exocitótica por estimulação eléctrica

Os diversos tipos de experiências de libertação por estimulação eléctrica incidiram sobre o estriado e o *accumbens*. Os resultados mais importantes observados no conjunto destas experiências são os seguintes:

- a estimulação eléctrica determina um muito marcado aumento de dopamina no efluente, que é acompanhado apenas por um muito modesto aumento do DOPAC, tanto no estriado como no *accumbens*;
- o aumento de dopamina no efluente, provocado pela estimulação eléctrica, é muito maior no caso do *accumbens* do que no estriado;
- o bloqueio da captação neuronial da dopamina intensifica ainda mais o aumento da dopamina no efluente, condicionado pela esimulação eléctrica, sem modificar o do DOPAC, tendo sido este efeito investigado apenas no estriado;
- o bloqueio dos receptores dopaminérgicos pré-sinápticos condicionou um forte aumento de dopamina no efluente, sem alterar o efluxo de DOPAC (apenas se observa um ligeiro aumento do efluxo de DOPAC no caso *accumbens*, mas não no do estriado);
- a activação dos referidos receptores dopaminérgicos pré-

sinápticos reduz o efluxo de dopamina, sem alterar o efluxo de DOPAC, tanto no estriado como no *accumbens*.

3-Libertação exocitótica por despolarização pelo potássio

As experiências de libertação exocitótica por despolarização pelo potássio incidiram apenas sobre o estriado. Os resultados obtidos são sobreponíveis aos observados com a estimulação eléctrica, pois mostraram que:

- a despolarização pelo potássio aumenta intensamente o efluxo de dopamina, sem modificar o efluxo de DOPAC;
- o aumento do efluxo de dopamina por despolarização pelo potássio é marcadamente intensificado pelo bloqueio dos receptores dopaminérgicos pré-sinápticos, sem que se verifique qualquer alteração do efluxo de DOPAC.

4-Libertação não exocitótica dependente da activação de um transportador transmembranoso

As experiências de libertação não exocitótica de dopamina por activação de um transportador transmembranoso foram realizadas apenas no estriado. A activação do transportador transmembranoso efectivou-se por diminuição das concentrações ou omissão do NaCl no líquido de superfusão. Os resultados obtidos mostram que:

- a activação do transportador transmembranoso condicionado por

diminuição das concentrações ou omissão do NaCl no líquido de superfusão determina um aumento progressivo do efluxo de dopamina tanto maior quanto menor é a concentração do NaCl (o aumento da dopamina atinge a sua expressão máxima nas experiências em que o NaCl é totalmente suprimido no meio de superfusão);

- a activação do referido transportador não afecta o efluxo de DOPAC (apenas quando se omite o NaCl no meio de superfusão o efluxo de DOPAC aumenta um pouco).

Conclusões:

O conjunto dos resultados até aqui resumidos indicam que:

- a síntese de dopamina é mais intensa no *nucleus accumbens* do que no estriado;
- não há relação entre o efluxo de dopamina e o efluxo de DOPAC, quer a libertação se promova por exocitose, quer seja provocada por um mecanismo não exocitótico;
- uma parte importante de dopamina libertada para a biofase é rapidamente captada pelos terminais neuroniais, sendo a quase totalidade desta amina armazenada ao abrigo da MAO axoplasmática;
- a quase totalidade do DOPAC presente no efluxo forma-se a partir de dopamina que nunca foi libertada do terminal dopaminérgico.

Estudo cinético da formação da dopamina, DOPAC e HVA

Este estudo incidiu em três áreas cerebrais de Rato (estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal) e baseou-se na determinação de dopamina, DOPAC e HVA nos tecidos das áreas cerebrais referidas. Os doseamentos foram realizados em animais de controlo e em animais com inibição da síntese de dopamina pela alfa-metil-p-tirosina. O doseamento das aminas e seus metabolitos a vários tempos após a administração do inibidor da hidroxílase da tirosina permitiu estabelecer as rectas de queda, determinar a taxa constante de queda, o tempo de renovação e a taxa de renovação, tanto da dopamina como do DOPAC e do HVA e calcular a razão DOPAC/dopamina. Os resultados obtidos podem resumir-se da seguinte forma:

Animais de controlo

- os valores absolutos de dopamina, DOPAC e HVA são mais elevados no estriado do que no *accumbens* e neste mais elevados do que no córtex pré-frontal, mas os valores da razão DOPAC/dopamina apresentam uma ordem quantitativamente inversa (mais altos no córtex pré-frontal e mais baixos no estriado).

Animais tratados com alfa-metil-p-tirosina

- o declínio dos contéudos tecidulares de dopamina e seus metabolitos no estriado e no *accumbens* aumentam com o tempo de inibição da hidroxílase da tirosina e faz-se de modo exponencial;

- nos mesmos animais, no que diz respeito aos metabolitos da dopamina, apenas foi possível a determinação do DOPAC no córtex pré-frontal nas amostras colhidas 1 hora após a inibição da hidroxílase da tirosina, mas o declínio da dopamina foi também exponencial;
- a taxa constante de queda da dopamina atingiu o valor mínimo no estriado, sendo 2 e 4 vezes mais elevada, respectivamente, no *accumbens* e no córtex pré-frontal;
- a taxa constante de queda do DOPAC e do HVA, no estriado e no *nucleus accumbens*, é superior à da dopamina, mas a taxa constante de queda destes metabolitos atinge valores mais altos no *accumbens* do que no estriado;
- o tempo de renovação da dopamina é maior no estriado do que no córtex pré-frontal, ocupando o *accumbens* uma posição intermédia;
- o tempo de renovação do DOPAC e do HVA é menor no *accumbens* do que no estriado, mas em ambos os casos menor que o tempo de renovação da dopamina.

Conclusões

Assumindo que a alfa-metil-p-tirosina apenas inibe a hidroxílase da tirosina, o conjunto dos resultados obtidos nesta série de experiências apontam para o seguinte:

- a inibição da síntese da dopamina diminui mais os teores de DOPAC e de HVA do que os da dopamina, sendo estes resultados mais marcados nas áreas cerebrais em que a síntese

se processa com mais intensidade;
- a razão DOPAC/dopamina é mais elevada nos tecidos cerebrais onde a síntese de dopamina é mais intensa;
- nas três áreas cerebrais estudadas a formação do DOPAC tem origem em dopamina recém-sintetizada.

Papel da MAO-A e da MAO-B no metabolismo da dopamina

Estas experiências foram realizadas também no estriado, *accumbens* e córtex pré-frontal de Rato, inibindo a MAO-A pela clorgilina, a MAO-B pela selegilina e simultaneamente a MAO-A e a MAO-B pela pargilina. Os principais resultados obtidos foram os seguintes:

- a inibição da MAO-B não altera as concentrações tecidulares de dopamina, DOPAC e HVA em qualquer das três áreas cerebrais estudadas;
- a inibição selectiva da MAO-A aumenta o teor tecidular de dopamina, o que tem expressão máxima no córtex pré-frontal e mínima no estriado e reduz drasticamente o teor de DOPAC e HVA tanto no córtex pré-frontal como no *accumbens* e no estriado;
- a intensidade destes efeitos depende do tempo de inibição da MAO-A, verificando-se com o decorrer do tempo que a diminuição do DOPAC é superior à diminuição do HVA;
- resultados semelhantes se observam quando se inibe simultaneamente a MAO-A e a MAO-B por um inibidor não

selectivo.

Conclusões

Estas experiências mostram que nos tecidos cerebrais estudados:

- a dopamina é essencialmente desaminada pela MAO-A, não tendo a MAO-B papel significativo no metabolismo da amina;
- a referida desaminação se faz a nível intraneuronial.

Estudo cinético da formação de 5-hidroxitriptamina e de 5-HIAA

Nestas experiências, realizadas em áreas cerebrais de Rato ricas em neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos (córtex pré-frontal, córtex parietal, estriado, *nucleus accumbens* e tronco cerebral), inibiu-se a síntese da 5-hidroxitriptamina por meio da inibição da hidroxílase do triptofano pelo 6-FT. Os resultados obtidos podem resumir-se assim:

- a administração de 6-FT não altera significativemente os teores tecidulares de dopamina, DOPAC, 3-MT, HVA, noradrenalina e MPHG, o que comprova a sua alta selectividade para a hidroxílase do triptofano;
- a inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina reduz os teores tecidulares da amina e do 5-HIAA em todas as áreas cerebrais estudadas;

- as taxas constantes de perda da 5-hidroxitriptamina variam conforme a área cerebral (por ordem decrescente : tronco cerebral > córtex pré-frontal > córtex parietal > estriado > *accumbens*);
- a redução dos teores de 5-HIAA é maior do que a da 5-hidroxitriptamina, salvo no tronco cerebral, área correspondente ao local de origem dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos;
- a taxa de síntese da amina é mais baixa no *accumbens*, seguindo-se por ordem crescente as do estriado, córtex parietal, córtex pré-frontal e tronco cerebral.

Conclusões

Estes estudos mostram que:

- uma fracção considerável de 5-hidroxitriptamina recém-sintetizada é desaminada em 5-HIAA.

Papel da MAO-A na metabolização da 5-hidroxitriptamina

Utilizando as cinco já referidas áreas cerebrais de Rato, determinaram-se os teores de 5-hidroxitriptamina e de 5-HIAA antes e depois da inibição da MAO-A pela clorgilina. Os resultados obtidos mostram essencialmente que:

- a inibição da MAO-A condiciona uma significativa descida do teor de 5-HIAA, que se faz de modo exponencial em todas as

áreas cerebrais estudadas, ao mesmo tempo que aumenta significativamente os teores de 5-hidroxitriptamina nos referidos tecidos;

- a taxa constante de acumulação da 5-hidroxitriptamina foi sempre menor do que a de queda do 5-HIAA.

Conclusões

Estes resultados harmonizam-se com os obtidos com a inibição da síntese da 5-hidroxitriptamina, pois mostram que:

- uma fracção considerável de 5-hidroxitriptamina recém-sintetizada é desaminada em 5-HIAA.

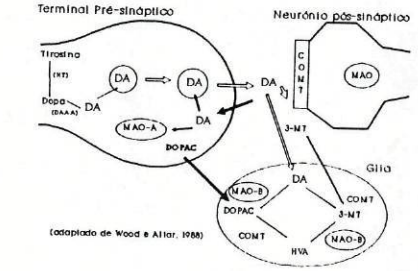
Conclusões finais:

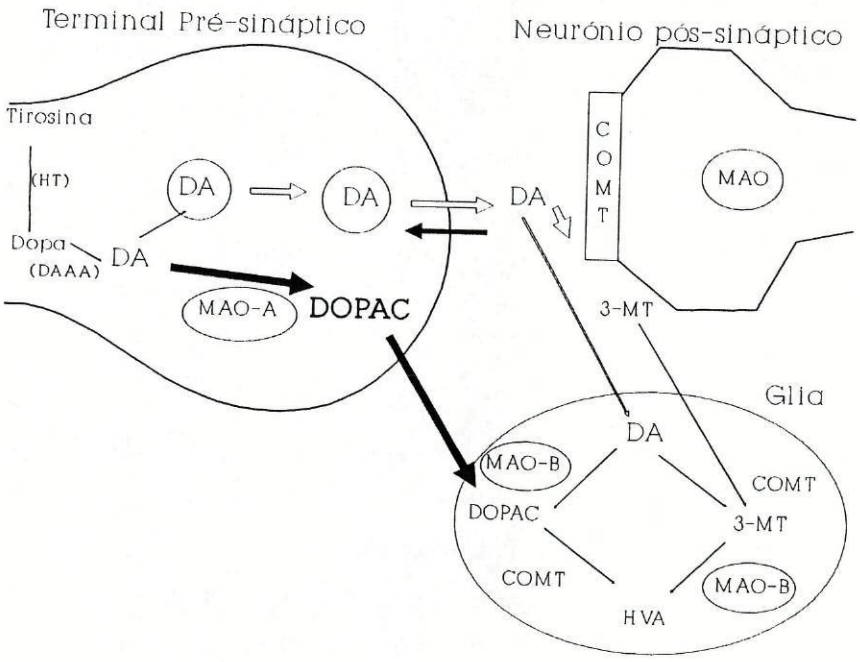
Do nosso estudo experimental, além do referido especialmente para cada série de experiências, retiramos as conclusões finais seguintes:

1- **A dopamina e a 5-hidroxitriptamina recém-sintetizadas são, na sua maior parte, desaminadas intraneuronialmente, antes de serem libertadas (esquema 2);**
2- **A maior ou menor quantidade de metabolitos da dopamina não está em relação com a maior ou menor quantidade de dopamina libertada, antes espelha a intensidade maior ou menor da síntese da amina;**

3- **O DOPAC e o HVA não devem ser utilizados como indicadores da libertação da dopamina;**

4- **O 5-HIAA não deve ser utilizado como indicador de libertação da 5-hidroxitriptamina**





Esquema 2- Metabolismo da dopamina, esquema proposto.

III-Capítulo 2

Parte Clínica

Introdução

Como já se referiu anteriormente, a doença de Huntington caracteriza-se clinicamente pela presença de perturbações motoras, cognitivas e emocionais, com início na idade adulta e evolução progressiva[147]. Dado ter uma transmissão autossómica dominante com uma penetrância quase completa e reduzida taxa de mutação, a existência de história familiar é essencial ao seu diagnóstico definitivo[84].

Classicamente, a coreia constitui a alteração clínica mais característica e apresenta-se de formas muito distintas; desde segmentar, pouco intensa e ocasional, até difusa, de intensidade severa e contínua. A coreia evoluí ao longo do tempo, nas fases mais tardias associa-se a alterações da postura nitidamente distónicas[39]. Outras alterações motoras surgem durante a respectiva evolução, tornando relativamente simples o diagnóstico diferencial com as outras coreias. A coexistência de bradicinésia é actualmente reconhecida[239]. De facto, na doença de Huntington várias perturbações motoras tem características muito próximas das observadas nos síndromes parkinsónicos: perda da tonalidade, timbre e modulação da voz[39], lentificação dos movimentos conjugados oculares, essencialmente dos voluntários[53], incapacidade na realização de actividades motoras complexas[239], na realização de movimentos rápidos[102] e na iniciação e rotação na marcha[131].

Apraxia facial e fala irregular, hesitante e explosiva, que com a evolução se pode tornar monossilábica e incompreensível, são frequentemente observadas no decurso da doença[39]. Disfagia e

incontinência esfincteriana aparecem apenas nas fases terminais[39].

As alterações mentais na doença de Huntington são precoces e podem surgir vários anos antes das perturbações da motricidade. Vários autores têm chamado a atenção para o facto de funções cognitivas particulares se encontrarem perturbadas na chamada fase "pré-sintomática". Na fase inicial da doença estas alterações cognitivas podem constituir a maior causa de deterioração funcional [114,150]. A deterioração cognitiva não é global, atingindo essencialmente a atenção, a capacidade de concentração e certos tipos de memória, tais como a evocação e a capacidade de aprendizagem de novos actos motores ou hábitos[114,166,191,209] e com uma característica conservação da linguagem[107,192,250].

As características da deterioração cognitiva na doença de Huntington assume , como já foi dito, um aspecto particular que a diferencia de outro tipo de demências, quer da demência de tipo Alzheimer quer de outro tipo de demências habitualmente consideradas como demências "sub-corticais"[191]. Através de testes neuropsicológicos é possível distinguir este tipo de perturbação cognitiva da que surge, por exemplo, nas demências de tipo Alzheimer[34,191,210]. Nas fases mais avançadas uma avaliação neuropsicológica dos doentes torna-se mais difícil, mas mesmo assim é possível verificar-se conservação na nomeação de objectos[34]. Comportamentos psicopáticos com irritabilidade, agressividade e manifestações anti-sociais são frequentes[39]. Dentro das perturbações do afecto a depressão é a mais comum[82,161]. Podem surgir quadros semelhantes à esquizofrenia, embora assumindo formas menos

sistematizadas[39].

Como já foi referido no início desta dissertação, as lesões cerebrais mais características da doença de Huntington são a atrofia e a perda celular do estriado e córtex cerebral[206]. A sua etiopatogenia é ainda hoje desconhecida. Contudo, sabe-se que a perda neuronial é mais marcada e precoce no estriado, que os neurónios mais atingidos são os espinhosos de tamanho médio, que utilizam o ácido gama-aminibutírico (GABA) como transmissor, e destes, os que se projectam no globo pálido lateral[1,3]. Acredita-se ser este o factor patogénico mais importante, pois verificou-se existir uma estreita correlação entre o grau de deterioração clínica e a gravidade das lesões ao nível do estriado[169].

Concomitantemente com as diversas perturbações neuroquímicas conhecidas nesta enfermidade, e apesar dos numerosos estudos já efectuados, as dúvidas relativas às alterações da transmissão dopaminérgica permanecem por esclarecer. Se, por um lado, foi sugerido que uma hiperactividade do sistema dopaminérgico nigro-estriado pudesse estar envolvida na génese de pelo menos alguns dos sintomas[217], sugestão esta apoiada na observação de que tanto os bloqueadores dos receptores da dopamina como os depletores dos neurónios dopaminérgicos são eficazes agentes terapêuticos na redução da intensidade da coreia[13,16,87,113,195,241], por outro, os resultados da quantificação da dopamina e HVA no tecido cerebral obtido por necrópsia e deste metabolito da dopamina no LCR de indivíduos afectados com esta doença mostraram variações de autor para autor, desde a redução e a

normalidade até ao aumento das concentrações, no tecido cerebral ou no LCR, destes compostos[17,24,25,157,183,200.231].

De facto, estes dois indicadores, dopamina e HVA, têm-se mostrado ineficazes no esclarecimento do estado da transmissão dopaminérgica na doença de Huntington. Em primeiro lugar, a atrofia de determinados grupos de neurónios em dada área cerebral pode resultar em aumento das concentrações do transmissor presente em fibras aferentes intactas[231]. Em segundo lugar, as concentrações do HVA no LCR dependem, não só da actividade dos sistemas dopaminérgicos cerebrais, mas também do volume ventricular[63].

Os resultados obtidos nas 3 primeiras séries experimentais do Capítulo 1, ao demonstrarem no Rato que o DOPAC tem origem em dopamina de síntese recente e que se forma essencialmente dentro do neurónio dopaminérgico, levaram-nos a pressupor ser este um indicador adequado da síntese da dopamina. A formação, tanto do HVA como da 3-MT, dependem de estruturas fora do neurónio dopaminérgico[132]- glia e neurónios pós-sinápticos. O facto de, na doença de Huntington, existir uma perda essencialmente dos neurónios pós-sinápticos em relação ao neurónio dopaminérgico, que se encontra preservado[206], chamou a atenção para a hipótese de o DOPAC poder ser o indicador mais adequado da função dopaminérgica nesta doença, porque a sua formação depende essencialmente da integridade dos respectivos neurónios e não da actividade de enzímas de localização extraneuronial, como acontece para a 3-MT e o HVA.

Nesta conformidade, o objectivo do presente trabalho foi o de

quantificar os níveis de dopamina e seus metabolitos (DOPAC , HVA e 3-MT) no LCR de doentes afectados de doença de Huntington. Como já foi referido anteriormente existem também resultados controversos a propósito do estado da transmissão noradrenérgica e 5-hidroxitriptaminérgico e como estes sistemas podem ter influência sobre a transmissão dopaminérgica cerebral procedeu-se ainda, à quantificação destas duas monaminas, noradrenalina e 5-hidroxitriptamina, e respectivos metabolitos, o MHPG e o 5-HIAA.

Material e Métodos

Material clínico

Os doentes estudados foram seleccionados na consulta de Doenças Extrapiramidais do Serviço de Neurologia e Neurocirurgia do Hospital de S.João. As histórias clínicas foram colhidas, quando possível, através de depoimento do próprio doente ou através de familiares. Os exames clínico e neurológico foram complementados por uma adaptação do Exame Neurológico Quantitativo (ENQ)[66]. O grau de incapacidade motora foi determinado através de uma subdivisão do ENQ, a Escala de Incapacidade Motora (EIM) obtida pelo somatório da pontuação referente a impersistência motora, disartria, alterações da marcha, adiadococinésia, presença de sinais de atingimento cortico-espinhal e de reflexos arcaicos. A intensidade da bradicinésia foi excluida da EIM e avaliada separadamente, através da observação dos doentes em repouso e durante o movimento. O estadio e o grau de incapacidade funcional da doença foi determinado conforme os critérios propostos por Shoulson e Fahn (1979)[221]. O grau de deterioração cognitiva foi determinado pelo "mini-mental state examination" (MMSE)[83]. Todos os doentes com pontuação igual ou superior a 24 foram considerados não deteriorados[34].

Em todos os doentes estudados fizeram-se os seguintes exames subsidiários: hemograma completo com contagem de acantócitos, determinação da actividade da creatinafosfocínase, doseamento do cobre sérico e ceruloplasmina, doseamento do cobre na urina de 24

horas, contagem diferencial de células e doseamento das proteínas totais no LCR e sua electroforese, electroencefalograma e tomografia computorizada cerebral. Em alguns doentes foi realizada ressonância magnética nuclear cerebral. Em apêndice são referidos os resumos do estudo clínico dos doentes e os testes utilizados.

Obteve-se consentimento verbal dos doentes e seus familiares ou tutores para a realização de exames subsidiários, nomeadamente a punção lombar, após a informação de que estes se destinavam a fins de investigação e não apenas para confirmação de diagnóstico.

Como grupo testemunha seleccionaram-se 12 indivíduos submetidos a punção lombar para realização de mielografia por suspeita de hérnia discal lombar (9) e fístula nasal de líquor (3), todos sem doença sistémica ou outra doença neurológica conhecida. Sete eram do sexo feminino e cinco do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 21 e os 64 anos, sendo a média ($\pm$EPM) das idades de 41,3 ($\pm$4,5). Nenhuma das suspeitas de fístula nasal de LCR (C2,C4 e C5) foi confirmada. Confirmou-se a existência de hérnia discal lombar sem bloqueio na circulação de LCR em 7 dos casos. C1 e C6 apresentaram mielografias lombares normais.

Colheita de LCR

Todos os doentes e indivíduos do grupo testemunha estavam internados na altura da punção lombar e não tinham sido medicados nas três semanas precedentes, com a excepção de analgésicos anti-inflamatórios. O LCR foi colhido por punção lombar realizada em decúbito lateral, entre as 9 e as 10 horas da manhã, após repouso no

leito de pelo menos 8 horas. Colheram-se 3 a 5 ml de LCR, o qual foi imediatamente congelado e armazenado a -40°C, até terem sido feitas as determinações das monaminas cerebrais e respectivos metabolitos.

Método analítico

A quantificação da dopamina não conjugada, DOPAC, 3-MT, HVA, noradrenalina, MHPG, 5-hidroxitriptamina e 5-HIAA foi realizada por cromatrografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica (HPLC-ECD), com a mesma metodologia descrita no capítulo 1. Em paralelo com as amostras de LCR, foram cromatografadas soluções padrão de dopamina, noradrenalina, 5-hidroxitriptamina, DOPAC, 3-MT, HVA, MHPG e 5-HIAA (fornecidos por Sigma Company, St.Louis, Mo, USA), para quantificação das aminas e metabolitos presentes na amostra. Nas amostras de LCR somente foi possível detectar a presença de dopamina, noradrenalina, DOPAC, HVA, MHPG e 5-HIAA (figura 13). Os cálculos foram efectuados com base na altura dos picos de cada composto em análise. Nestas condições experimentais os limites de detecção (em fmol/ 50 μl de LCR) dos compostos detectados foram os seguintes: noradrenalina-30, dopamina-35, MHPG-250, DOPAC-60, HVA-500 e 5-HIAA-250. Para a quantificação da dopamina e noradrenalina, colocaram-se 3-4 ml de LCR em tubos cónicos de vidro com 50 mg de alumina; o pH foi ajustado imediatamente a 8,6 pela adição de tampão TRIS. Após 10 minutos de agitação mecânica, procedeu-se à centrifugação e

rejeição do sobrenadante. As catecolaminas adsorvidas foram então eluídas num filtro Millipore (MF 1) com 150 a 200 μl de ácido perclórico (0,1 mmol/l). 50 μl de eluído foi injectado no cromatógrafo. A quantificação do DOPAC, do HVA, da 3-MT, do MHPG e do 5-HIAA foi feita pela injecção directa na coluna do cromatógrafo de 50 μl de LCR previamente filtrado num filtro Milipore (MF 1). A diidroxibenzilamina (DBA) foi utilizada como padrão interno e todos os cálculos tiveram em consideração a taxa de recuperação deste composto durante o processo de extracção ou filtragem.

Estatística.

Os dados obtidos no estudo de 11 indíviduos afectados com doença de Huntington e de 12 indíviduos constituindo o grupo testemunha, foram utilizados para análise estatística. Os níveis de dopamina, DOPAC, HVA, noradrenalina, MHPG e 5-HIAA no LCR do grupo e doentes e do grupo testemunha foram comparados usando-se um teste não paramétrico para dados não emparelhados, o teste U de Mann-Withney. O valor de $P<0,05$ foi considerado como refletindo uma diferença estatisticamente significativa. Os valores indicados no texto são médias $\pm$ EPM. As correlações (r) entre as os diversos parâmetros avaliados em 16 observações foram obtidas por regressão linear e a recta construída com base na determinação de 2 pontos teóricos. Admitiu-se como estatísticamente significativo um limite de confiança superior a 95% ($P<0,05$).

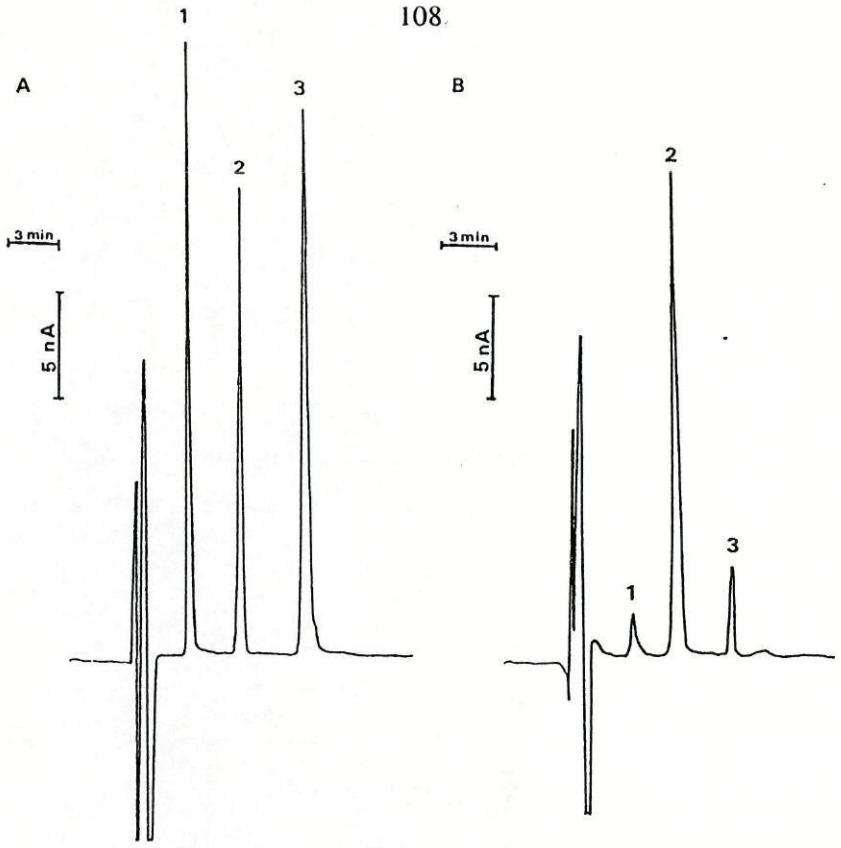


Figura 13. Cromatogramas típicos de amostras de LCR de um doente com doença de Huntington e de soluções padrão de noradrenalina, dopamina, ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), 3-metoxitiramina (3-MT), ácido homovanílico (HVA), 3-metoxi-4-hidroxifeniletilglicol (MHPG), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). . Em **(A)** observa-se cromatograma de uma solução padrão (1) noradrenalina , (2) diidroxibenzilamina e (3) dopamina. Em **(B)** observa-se um traçado cromatográfico de uma amostra de LCR destinada à quantificação de (1) noradrenalina e (3) dopamina. Em **(C)** cromatograma de uma solução padrão de (1) MPHG, (2) diidroxibenzilamina , (3) DOPAC, (4) 3-MT, (5) 5-HT (6) 5-HIAA e (7) HVA. Em **(D)** traçado cromatográfico de uma amostra de LCR destinada à quantificação de (1) MPHG, (2) diidroxibenzilamina , (3) DOPAC, (4) 3-MT, (5) 5-HT (6) 5-HIAA e (7) HVA. A concentração da noradrenalina e dopamina na solução padrão era de 6 pmol/50 μl de volume injectado na coluna do cromatógrafo e a concentração do MHPG, DOPAC, 3-MT, 5-HT, 5-HIAA e HVA na solução padrão era de 3 pmol/50 μl de volume injectado na coluna do cromatógrafo.

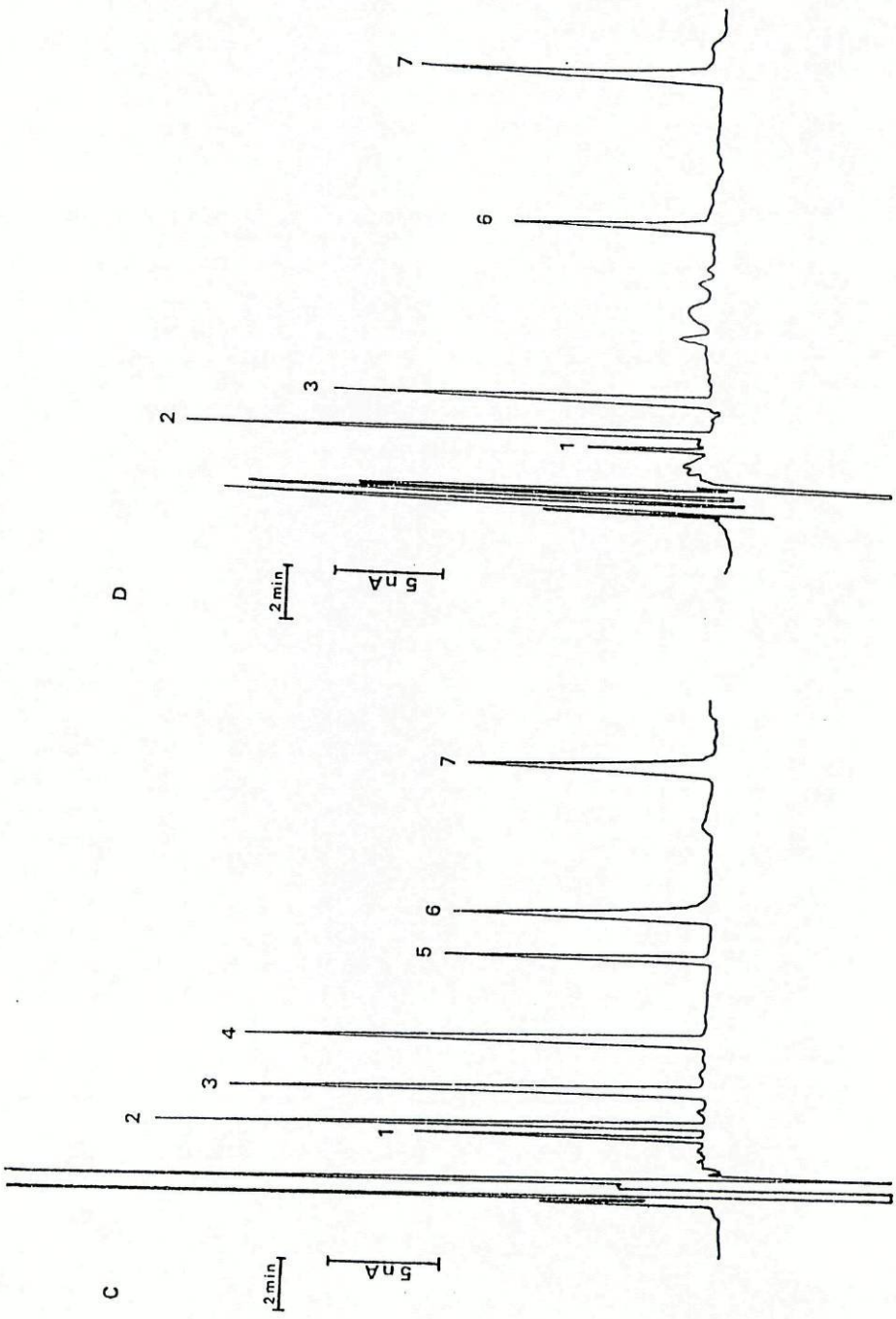


Figura 13 (cont.) ver legenda pag. 108

Resultados

Estudo clínico

O grupo de doentes estudado era composto por 11 indíviduos, provenientes de 8 famílias, preenchendo os critérios clínicos para o diagnóstico definitivo de doença de Huntington[84] (tabela 6).

Tabela 6. Resumo dos aspectos clínicos dos doentes estudados.

Doente/ observação	Idade	Sexo	Tempo de evolução (anos)	Inc.funcional (Estadio)	Progenitor afectado	AC/DV *
H1	45	M	10	0(5)	?	presente
H2	32	F	7	4(3)	Pai	ausente
H3 1ª	30	M	1	12(1)	Pai	ausente
2ª	35		7	4(3)		ausente
H4 1ª	32	F	8	5(3)	Mãe	ausente
2ª	33		9	4(3)		ausente
3ª	34		10	2(4)		ausente
H5 1ª	32	F	4	11(1)	Mãe	ausente
2ª	35		7	5(3)		ausente
H6	49	F	12	6(3)	Pai	ausente
H7 1ª	52	F	4	11(1)	Pai	ausente
2ª	55		7	6(3)		ausente
H8	37	M	10	6(3)	Pai	ausente
H9	69	F	10	11(1)	Pai	ausente
H10	54	F	19	1(4)	Pai	presente
H11	47	M	7	6(3)	Mãe	ausente

AC/DV-Atrofia cerebral/ dilatação ventrícular;
M-Masculino; F-Feminino;
Incapacidade Funcional/estadio(0=5; 1-2=4; 3-7=3; 7-11=2; 12-13=5)

Os doentes apresentavam nos seus antecedentes familiares pelo menos um elemento com as características clínicas próprias da doença (observadas por um neurologista ou um psiquiatra) para além de coreia de aparecimento na idade adulta. A evolução da sintomatologia verificou-se ser progressiva e associada a outras alterações da motricidade. Como se pode observar na tabela 6, o grupo era composto por 7 mulheres e 4 homens com idades variando entre os 30 e os 69 anos (43,6±3,7). A idade de início da doença foi determinada pelo aparecimento da coreia e oscilou entre os 24 e os 59 anos (33,7±2,6); em 5 doentes a sintomatologia coreica manisfestou-se na 3ª década da vida, em 5 doentes na 4ª e 5ª décadas e apenas o doente H9 apresentou uma idade de início mais tardia, na 6ª década. O grupo de doentes estudado apresentava formas clássicas da doença em diversos estadios correspondentes a diferentes graus de incapacidade funcional. A maioria dos doentes encontrava-se em estadio 1-3 (H2, H3, H4, H5, H6, h7, H8, H9 e H11). Dois doentes encontravam-se em estadios avançados da doença (H1 e H10). Em 10 doentes foi possível determinar qual o sexo do progenitor afectado, não se observando maior predominância de transmissão paterna nas idades mais precoces e materna nas mais tardias. Tal como se refere na tabela 1, somente os doentes H1 e H10 apresentavam atrofia cerebral difusa com dilatação ventrícular. No entanto, os restantes doentes apresentavam critérios para afirmar a existência de evidente atrofia do núcleo caudado, com excepção do doente H9. O tempo de evolução variou entre os 1 e os 19 anos (8,2±1,0) e correlacionou-se com o grau de incapacidade funcional (r=-0,6404,

$P < 0,05$, $n = 16$, figura 14).

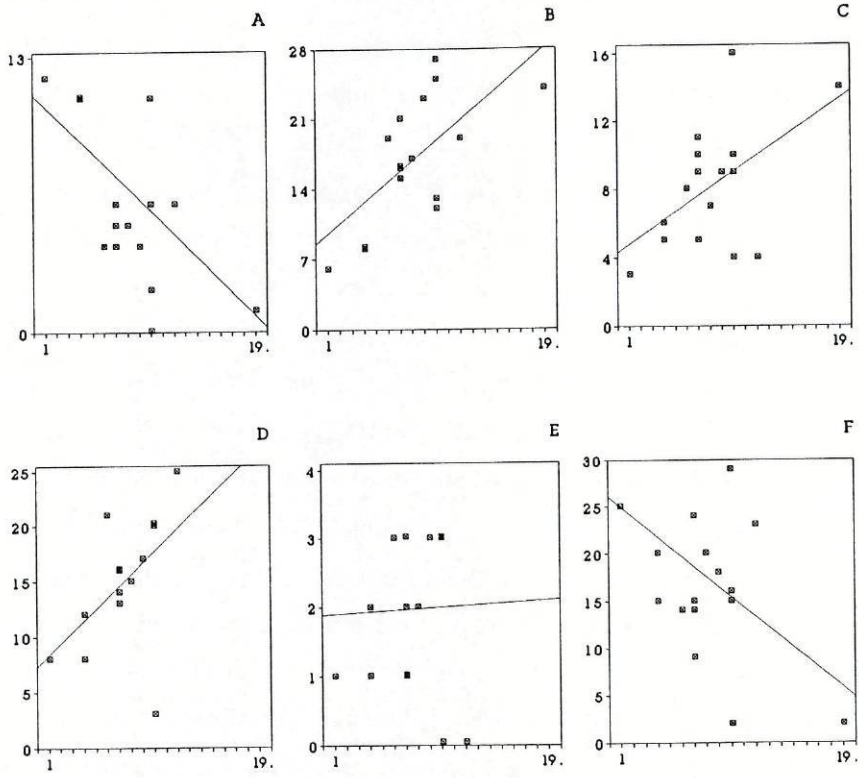


Figura 14. Correlações entre o tempo de evolução (em anos) e:

A-Grau de incapacidade funcional, $r = -0,6404$, $P < 0,05$.

B-Pontuação da EIM, $r = 0,6661$, $n = 16$, $P < 0,05$

C-Intensidade das perturbações dos movimentos conjugados oculares, $r = 0,5300$, $n = 16$.

D-Intensidade da coreia, $r = 0,5173$, $n = 14$.

E-Intensidade da bradicinésia, $r = 0,0201$, $n = 14$.

F-Pontuação do "MMSE", $r = -0,4362$, $n = 16$.

Cada ponto representa a pontuação de cada avaliação e a recta representa a correlação existente entre os 2 parâmetros avaliados.

A avaliação da função motora (ver tabela 7) foi realizada tendo em consideração 4 aspectos: (1) intensidade da coreia e (2) da bradicinésia, (3) alteração dos movimentos conjugados oculares e (4) da escala de incapacidade motora (EIM).

Tabela 7. Resumo do "Exame Neurológico Quantitativo" e do "Mini Mental State Examination".

Doente/ observação	ENQ 0-100	EIM 0-28	MCO 0-16	COREIA 0-25	BRADICINÉSIA 0-4	"MMSE" 30-0
H1	81	27	16	n.p.	n.p.	2
H2	47	15	5	13	1	14
H3 1ªobs.	22	6	3	8	1	25
2ªobs.	72	19	8	21	3	14
H4 1ªobs.	53	17	7	15	2	20
2ªobs.	74	23	9	17	3	18
3ªobs.	82	25	10	20	3	15
H5 1ªobs.	33	8	5	8	2	15
2ªobs.	67	21	9	14	3	9
H6	64	19	4	25	0	23*
H7 1ªobs.	34	8	6	12	1	20
2ªobs.	55	16	10	16	1	15
H8	38	13	9	3	3	16
H9	46	12	4	20	0	29
H10	80	24	14	n.p.	n.p.	2
H11	52	16	11	16	2	24

ENQ-Exame Neurológico Quantitativo; EIM-Escala de Incapacidade Motora;MCO-movimentos conjugados oculares; MMSE-"Mini Mental State Examination"; * doente analfabeto.

Na maioria dos doente, a coreia era muito frequente ou contínua, com uma distribuição difusa e de intensidade variável. O doente H3 apresentava, na 1ª observação, movimentos coreicos de intensidade moderada e permanentes no membro superior direito e ocasionais e de intensidade ligeira no tronco, que com o tempo evoluiu para uma coreia contínua e difusa. O doente H8 apresentava apenas movimentos coreicos ligeiros dos dedos das mãos, que não se agravaram com a evolução da doença. Os doentes H1, H10, H3 (2ª observação), H4 (2ª e 3ª observação) e H6 apresentavam movimentos distónicos de intensidade e distribuição variáveis. Nos doente H1 e H10 era difícil a pontuação da coreia segundo o esquema utilizado. Estes doentes apresentavam uma coreia contínua, difusa e de intensidade moderada. A correlação da gravidade da coreia com o tempo de evolução ($r=0,5173$, $n=14$, figura 14) e grau de incapacidade funcional ($r=0,3846$, $n=14$, figura 15) não se mostram estatisticamente significativas.

A bradicinésia, manisfestação importante em alguns doentes (H3-2ª observação, H4, H5, H8 e H11), evidenciava-se tanto pela lentificação dos movimentos como pela postura de tipo parkinsónico. A bradicinésia tinha a sua expressão máxima no doente H8, o qual apresentava uma postura nitidamente parkinsónica e uma marcada lentificação dos movimentos. Nos doentes H3 (2ª observação) e H4, os quais apresentavam coreia de intensidade moderada, foi possível observar também postura de tipo parkinsónico e lentificação marcada dos movimentos. De notar que nestes dois doentes (H3 e H4) as manisfestações coreicas se tornavam altamente incapacitantes durante a actividade motora

voluntária. Tal como para a coreia, a pontuação da bradicinésia segundo o esquema proposta era difícil nos doentes H1 e H10, embora a postura e a movimentação voluntária nestes doentes não pudesse ser classificada como bradicinética.

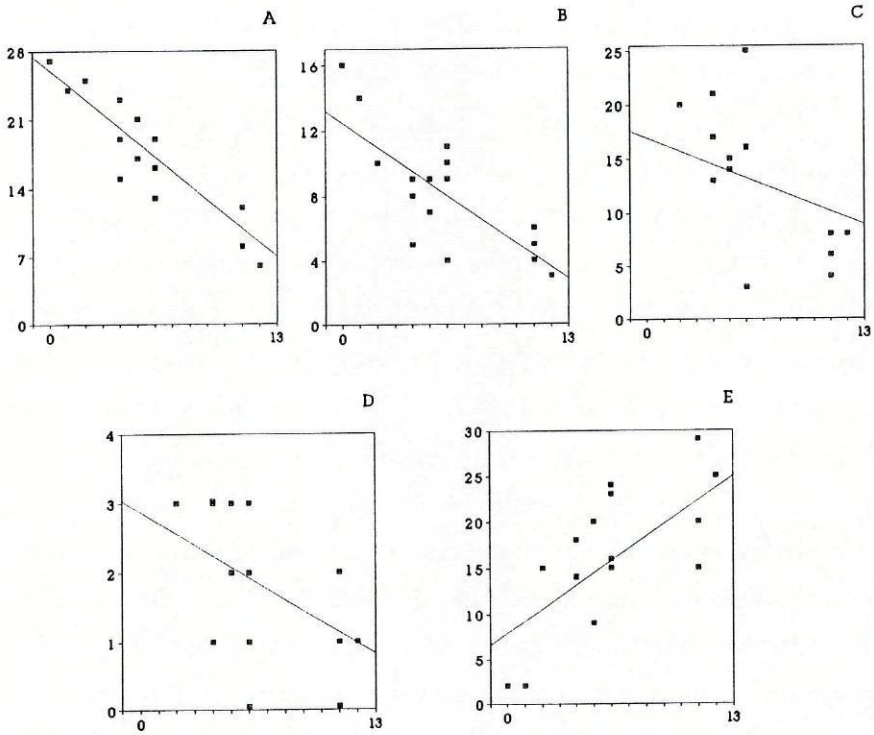


Figura 15. Correlações entre o grau de incapacidade funcional dos doentes e:

A-Pontuação da EIM, r=0,9304, n=16, P<0,01.

B-Intensidade das perturbações dos movimentos conjugados oculares, r=0,7808, n=16, P<0,01.

C-Intensidade da coreia, r=0,3846, n=14.

D-Pontuação do "MMSE", r=-0,7238, n=16,P<0,01.

E-Intensidade da bradicinésia, r=0,5544, n=14.

Cada ponto representa a pontuação de cada avaliação e a recta representa a correlação existente entre os 2 parâmetros avaliados.

A intensidade da bradicinésia não se correlacionou nem com o tempo de evolução da sintomatologia ($r=0,0201$, $n=14$, figura 14), nem com o grau de incapacidade funcional ($r=-0,5544$, $n=14$, figura 15). Contudo verificou-se existir correlação com a idade de início da doença ($r=-0,6785$, $P<0,05$, $n=14$).

Todos os doentes apresentavam alteração dos movimentos conjugados oculares, com lentificação marcada dos movimentos sacádicos, quase sempre acompanhados de movimento da cabeça. Os movimentos oculares de perseguição encontravam-se também alterados, embora menos que os sacádicos. A intensidade das alterações dos movimentos conjugados oculares não se correlacionou de forma significativa com o tempo de evolução da doença ($r=0,5300$, $n=16$, figura 14), mas sim com o grau de incapacidade funcional, ($r=0,7808$, $P<0,01$, $n=16$, figura 15), com a pontuação obtida na EIM ($r=O,7419$, $n=16$, $P<0,01$) e com a bradicinésia ($r=0,6899$, $P<0.05$, $n=14$, figura 16).

Para além destas perturbações da motricidade, os doentes apresentavam dificuldade na realização de movimentos alternados, impersistência motora, apraxia facial, alterações da marcha e da fala e alterações compatíveis com atingimento córtico-espinhal, cujo somatório define a escala de incapacidade motora (EIM). Igualmente, foi possível verificar a presença de uma correlação positiva entre o tempo de evolução da doença e o grau de incapacidade funcional e a pontuação obtida na EIM (respectivamente $r=0,6661$, $P<0,05$, $n=16$ e $r=-0,9304$, $P<0,01$, $n=16$; figura 14 e 2). A pontuação obtida na EIM correlacionou-se também com a intensidade de perturbação dos movimentos

conjugados oculares e com a coreia (respectivamente, r=0,7419, P<0,01, n=16; r=0,6127, P<0,05, n=14, figura 16).

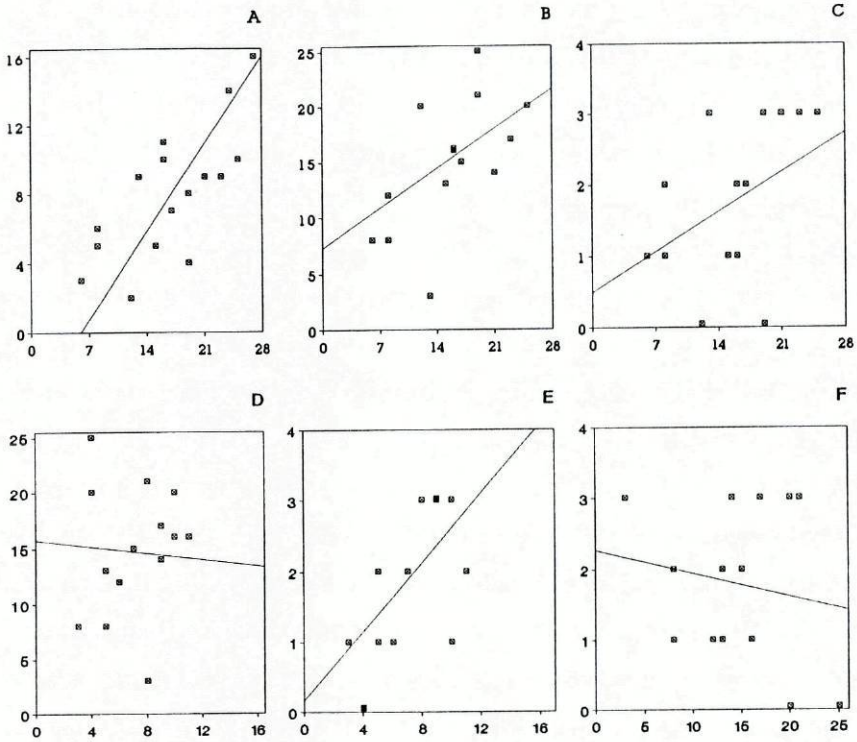


Figura 16. Correlações entre os diversos parametros motores avaliados:

A-Pontuação da EIM e intensidade das perturbações dos movimentos conjugados oculares, r=0,7419, n=16, P<0,01.

B-Pontuação da EIM e intensidade da coreia, r=0,6127, n=14, P<0,05.

C-Pontuação da EIM e a intensidade da bradicinésia, r=0,4881, n=14.

D-Intensidade das perturbações dos movimentos conjugados oculares e da coreia, r=-0,0064, n=14.

E-Intensidade das perturbações dos movimentos conjugados oculares e da bradicinésia, r=0,6899, n=14, P<0,05

F-Intensidade da coreia e da bradicinésia, r=-0,2342, n=14.

Cada ponto representa a pontuação de cada avaliação e a recta representa a correlação existente entre os 2 parâmetros avaliados.

A maioria dos doentes apresentava pontuação no "MMSE" inferior a 24, compatível segundo os critérios de Brandt e col. (1988) com demência (tabela 7). Dois doentes (H1 e H10) encontravam-se acamados, profundamente disártricos, sendo difícil fazer uma avaliação precisa da deterioração do estado mental. No entanto estes doentes eram ainda capazes de nomear objectos e reagiam à presença de familiares directos, por vezes emocionalmente. Os doentes H3 (1ª observação), H6, H9 e H11 apresentavam pontuações iguais ou superiores a 24 no "MMSE", enquanto os restantes doentes apresentavam graus diferentes de deterioração cognitiva (tabela 7). A pontuação obtida no "MMSE" correlacionou-se com o grau de incapacidade funcional ($r=0,7238$, $P<0,01$, $n=16$; figura 15), com os parâmetros pertencentes à EIM ($r=-0,6222$, $P<0,05$, $n=16$; figura 17), com as alterações dos movimentos conjugados dos olhos ($r=-0,7517$, $P<0,01$, $n=16$, figura 17) e com a intensidade da bradicinésia ($r=0,6450$, $P<0,05$, $n=14$; figura 17). A correlação com o tempo de evolução, tal como para os outros parâmetros avaliados à excepção da EIM, não atingiu significado estatístico ($r=-0,4377$, $n=16$; figura 14). Analisando os resultados obtidos com o "MMSE", pode verificar-se que o grupo de doentes estudado apresentava baixa pontuação nos "item" referentes à atenção e à evocação, com um atingimento menos marcado no que se refere à orientação, memória imediata e linguagem (figura 18). De notar que nos doentes mais deteriorados a linguagem era o único parâmetro no qual ainda era possível obter pontuação.

A maioria dos doentes apresentava irritabilidade fácil

acompanhada de agressividade, perda de flexibilidade nos processos de pensamento e raciocinio, egocentrismo exagerado e iniciativa pobre.

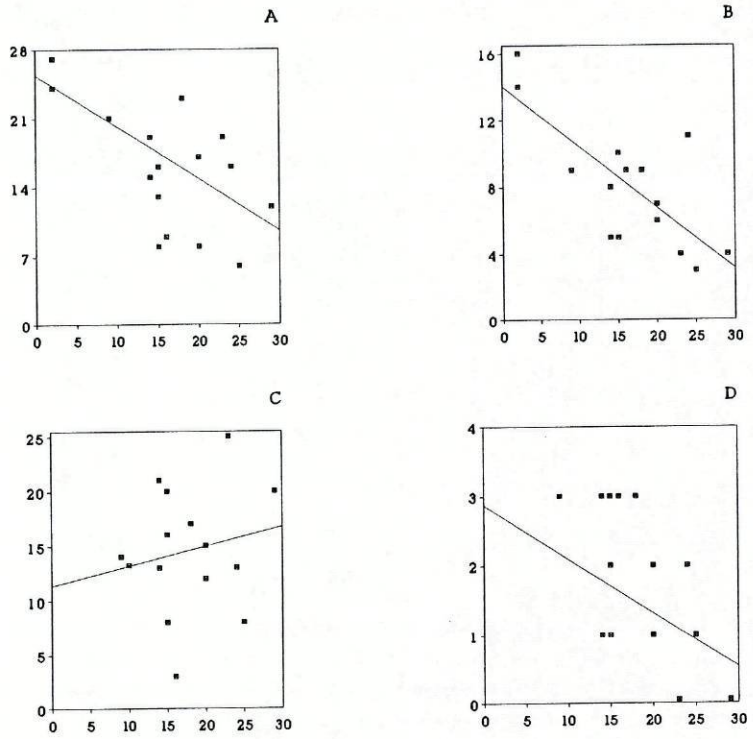


Figura 17. Correlações entre a pontuação do "MMSE" e os diversos parâmetros motores avaliados:

A-Pontuação da escala de incapacidade motora, r=-0,6222, n=16, P<0,05.

B-Intensidade das perturbações dos movimentos conjugados oculares, r=-0,7517, n=14, P<0,01.

C-Intensidade da coreia, r=-0,1445, n=14.

D-Intensidade da bradicinésia, r=4881, n=14.

Cada ponto representa a pontuação de cada avaliação e a recta representa a correlação existente entre os 2 parâmetros avaliados.

Duas doentes (H4 e H7) apresentaram no decurso do período de observação episódios depressivos; a primeira na 2ª e 3ª avaliação e a segunda por altura da 1ª avaliação. Com a evolução da doença, o doente H3 veio a apresentar um comportamento psicótico de tipo esquizóide.

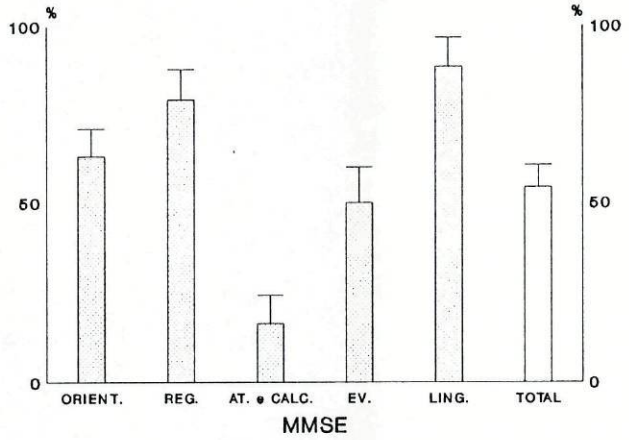


Figura 18. Pontuações obtidas na avaliacão dos 11 doentes através do "Mini Mental State Examination"("MMSE"). Os resultados são apresentados em percentagem da pontuação máxima. As barras a cheio representam a média + EPM de 16 avaliações de cada um dos parâmetros que o constituem. A barra em aberto reprenta a pontuação total (média + EPM) do "MMSE".

Doseamento de monaminas no LCR

Nas amostras de LCR estudadas, não foi possível detectar 5-hidroxitriptamina e 3-MT. Como se pode observar nas figuras 6, 7 e 8, o HVA, o 5-HIAA, a noradrenalina e o MHPG foram sistemáticamente detectados no LCR dos dois grupos de indivíduos em estudo; quantificou-se o DOPAC, metabolito desaminado da

dopamina, no LCR de todos os doentes com doença de Huntington e na maioria dos indivíduos do grupo testemunha (com excepção de C12). Foi ainda possível determinar as concentrações da dopamina no LCR de 9 doentes coreicos e no LCR de 2 indivíduos do grupo testemunha. No LCR dos doentes coreicos, nos quais foi possível detectar dopamina, esta atingiu níveis consideráveis ($497,2 \pm 154,4$ fmol/ml; $n=11$); a média das concentrações da dopamina no LCR dos doentes coreicos era cerca de 10 vezes superior às concentrações da amina determinada no LCR dos indivíduos do grupo testemunha C3 e C7 (respectivamente 45,1 e 46,6 fmol/ml; ver figura 19). Os níveis do DOPAC no LCR dos doentes coreicos ($67,8 \pm 9,3$ pmol/ml, $n=11$) encontravam-se marcadamente (14 vezes) aumentados quando comparados com os níveis deste metabolito no LCR dos indivíduos testemunha ($4,8 \pm 1,3$ pmol/ml, $n=12$, figura 19). Os níveis de HVA no LCR dos doentes com doença de Huntington ($223,7 \pm 36,6$ pmol/ml) não eram significativamente diferentes dos observados no LCR dos indivíduos do grupo testemunha ($160,8 \pm 16.7$ pmol/ml) (figura 19). A média da soma dos dois metabolitos quantificados, DOPAC e HVA, era significativamente superior no LCR do grupo constituido pelos indivíduos afectados de doença de Huntington quando comparados com a média da soma dos mesmos metabolitos no LCR do grupo testemunha (respectivamente, $291,5 \pm 36,3$ pmol/ml e $165,5 \pm 17,2$ pmol/ml, $P<0,005$). O contrário se verificou com a razão HVA/DOPAC. Esta era significativamente inferior no LCR do grupo de doentes em comparação com a observada no LCR do grupo testemunha (respectivamente, $4,1 \pm 1,0$ e $58,1 \pm 15,1$, $P<0,0001$).

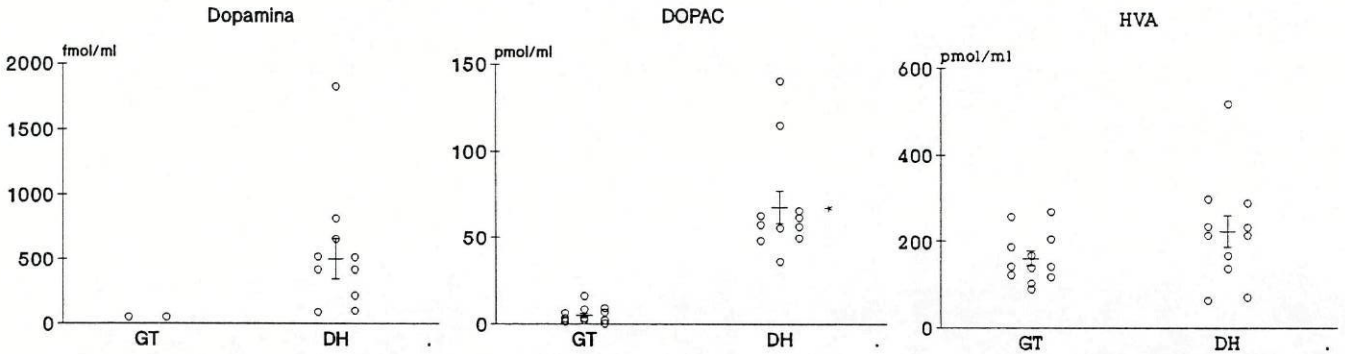


Figura 19. Concentrações de dopamina, DOPAC e HVA no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (GT) e dos 11 doentes afectados de doença de Huntington (DH). Cada ponto representa as concentrações individuais de cada composto e a barra horizontal representa a média das respectivas concentrações. A dopamina foi detectável em 17% dos indivíduos do grupo testemunha e em 82% dos doentes. O DOPAC foi detectado em 92% dos grupo testemunha e em todos os doentes. O HVA foi detectado na totalidade dos LCR analizados.

* $P<0.00001$ comparando as médias das concentrações pelo método do teste U de Mann-Withney.

Não se encontrou qualquer tipo de correlação entre os níveis de dopamina ou de DOPAC e os diversos parâmetros clínicos, nomeadamente com a gravidade da coreia ($r=-0,1214$ e $r=-0,1893$, $n=14$), da bradicinésia ($r=-0,1892$ e $r=0,0311$, $n=14$) ou da pontuação obtida no "MMSE" ($r=-0,2136$ e $r=-0,2405$, $n=16$).

Contudo, foi possível verificar a presença de uma correlação negativa do HVA com a bradicinésia ($r=-0,8477$, $n=14$, $P<0,01$), mas não com a coreia ($r=0,1724$, $n=14$).

Com efeito, nos doentes em que a coreia constituia o sintoma neurológico mais notório (H1, H2, H3 1ªobs, H6, H7, H9 e H10) os níveis do HVA ($263,2\pm41.5$ pmol/ml, $n=7$) eram significativamente superiores $P<0,005$) aos observados no LCR do grupo testemunha.

Contudo, tal como se pode observar na tabela 8, o progressivo agravamento da coreia nos doentes H3, H4, H5 e H7 não se acompanhou de modificação significativa do HVA no LCR. Pelo contrário, nos doentes H3 (2ªobs), H4, H5, H8 e H11, nos quais predominava a bradicinésia, os níveis do HVA ($97,9\pm18,4$ pmol/ml, $n=5$) eram significativamente inferiores ($P<0,005$) aos observados no LCR do grupo testemunha.

Verificou-se ainda que a razão HVA/DOPAC nos doentes com coreia ou bradicinésia predominante eram significativamente diferentes entre si (respectivamente, $4,8\pm1,5$ e $1,9\pm0,6$, $P<0.05$), assim como a soma dos dois metabolitos da dopamina, o DOPAC e O HVA (respectivamente, $168,5\pm23,1$ e $336,6\pm37,7$ pmol/ml, $P<0,01$).

Tabela 8. Concentrações de dopamina, DOPAC, HVA, noradrenalina, MOPEG e 5-HIAA no LCR de doentes afectados de doença de Huntington (H3, H4 e H7) sujeitos a mais que uma avaliação.

doente/ ano	dopamina fmol/ml	DOPAC pmol/ml	HVA pmol/ml	Noradrenalina fmol/ml	MOPEG pmol/ml	5-HIAA pmol/ml
H3 /						
1984	648,7	65,5	212,7	1615,4	49,3	250,1
1989	86,4	27,1	155,5	378,8	27,1	2,6
H4 /						
1987	515,7	57,2	70,2	427,8	18,7	93,1
1988	172,3	86,1	32,2	227,2	12,6	0
1989	n.d.	42,5	30,7	305,6	21,8	28,1
H5 /						
1987	412,9	62,5	166,4	535,1	29,9	111,8
1990	1274.1	177,0	99,8	423.6	20,7	59,3
H7 /						
1988	n.d.	139,8	231,9	618,9	20,0	15,1
1990	395.0	73.8	110.8	398.3	22.2	106.6

n.d.-não detectável

Como se pode observar na figura 7, os níveis de noradrenalina no LCR nos dois grupos de indivíduos estudados eram idênticos (doença de Huntington 991,2$\pm$201,6 fmol/ml, grupo testemunha 591.8$\pm$70,6 fmol/ml). Da mesma forma, os níveis de MHPG no LCR dos doentes com doença de Huntington (31,3$\pm$4,6 pmol/ml) não diferiam dos observados no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (18,8$\pm$1,6 pmol/ml), tal como também não diferia a razão MHPG/noradrenalina (24,3$\pm$3,1; 33,1$\pm$3,7, respectivamente).

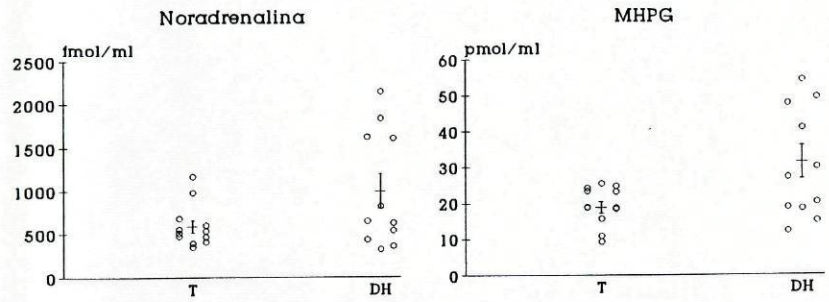


Figura 20. Concentrações de noradrenalina e MHPG no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (GT) e dos doentes afectados de doença de Huntington (DH). Cada ponto representa as concentrações individuais de cada composto e as barras horizontal representam a média das respectivas concentrações. Estes compostos foram detectados na totalidade dos LCR analizados.

Embora a 5-hidroxitriptamina não tivesse sido detectada, o 5-HIAA estava presente nos LCR estudados. Como se pode observar na figura 8, os níveis do 5-HIAA eram idênticos no LCR dos dois grupos estudados (doença de Huntington 159,2$\pm$29,3 pmol/ml, grupo testemunha 117,9$\pm$9.6 pmol/ml). Nos doentes H3 (2ª observação), H4 (2ª e 3ª observações) e H7 (1ª observação) os níveis de 5-HIAA estavam nitidamente abaixo dos valores encontrados nos indivíduos do grupo testemunha. Dois destes doentes (H4 e H7) encontravam-se clinicamente deprimidos na altura em que a punção lombar foi realizada. As concentrações de 5-HIAA no LCR dos doentes afectados de doença de Huntington correlacionaram-se negativamente com a intensidade da bradicinésia ($r=-0,6802$, $p<0,05$).

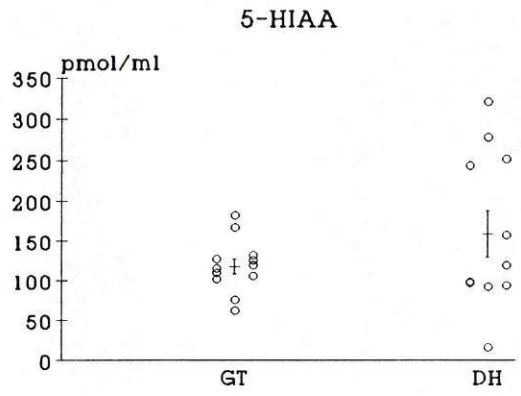


Figura 21. Concentrações de 5-HIAA no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (GT) e dos doentes afectados de doença de Huntington (DH). Cada ponto representa a concentração individual do composto e a barra horizontal representa a média das respectivas concentrações. Este composto foi detectado na totalidade dos LCR analizados.

Discussão

Estudo clínico

No estudo clínico deste grupo de doentes verificou-se que todos apresentavam alterações da função motora e a maioria perturbações cognitivas e emocionais, embora a gravidade de cada uma destas alterações fosse variável de caso para caso; tal sugere a presença de uma expressão fenotípica diferente. Esta variação da expressão fenotípica da doença era evidente no nosso grupo de doentes, mesmo em elementos da mesma família (H5 e H6, H7 e H8), e estaria em concordância com a teoria da homogeneidade genética nesta doença, a mais aceite na actualidade[55]. Com efeito, foi possível determinar no grupo de doentes estudado a presença de diferenças na forma de apresentação da doença. Dois doentes, H6 e H9, apresentavam uma forma de patologia caracterizada por coreia com atingimento difuso, contínua e de intensidade severa, com uma evolução progressiva, alterações motoras incluídas na escala de incapacidade motora e dos movimentos conjugados dos olhos de gravidade ligeira e ausência de bradicinésia, deterioração cognitiva ou alterações emocionais. Os doentes H5, H8 e H11 apresentavam, desde o início da doença, bradicinésia clinicamente evidente, coreia de intensidade ligeira, outras alterações da motricidade, demência e alterações emocionais. Neste grupo poder-se-iam incluir os doentes H3 e H4, que apesar da coreia altamente incapacitante apresentavam uma bradicinésia bem evidenciada em repouso e lentificação do movimento voluntário. Num terceiro grupo, encontravam-se 4

doentes evidenciando perturbações motoras (com ou sem bradicinésia clinicamente evidente), cognitivas e emocionais, sem predomínio manifesto de qualquer um dos parâmetros avaliados. Contudo, esta divisão não sugere necessariamente a presença de diferentes subtipos de doença, mas sim parece corresponder a diferentes tipos de apresentação de uma única entidade clínica.

A análise dos resultados referente a 16 avaliações clínicas revelou a presença de correlação estreita entre determinados parâmetros clínicos.

O tempo de evolução da doença apenas se correlacionou de forma estatisticamente significativa com a EIM, embora no caso do grau de perturbação dos movimentos conjugados oculares o valor de *r* se aproximasse do limite de confiança. Do exame clínico dos doentes avaliados mais do que uma vez, verificou-se existir um agravamento destes parâmetros. Em relação ao grau de incapacidade funcional, os valores de *r* obtidos sugerem serem as alterações motoras que constituem a escala de incapacidade motora e o grau de perturbação dos movimentos conjugados oculares os que mais se relacionam com a deterioração funcional. Existe evidência de que as alterações dos movimentos conjugados oculares e de alguns dos movimentos incluídos na EIM estão relacionados com a perda da integridade funcional dos gânglios da base[4].

A alteração motora mais característica da doença de Huntington é a coreia. A intensidade da coreia no grupo de doentes estudado não se correlacionou nem com o tempo de evolução nem com o grau de incapacidade funcional. Acresce ainda não se ter observado uma correlação estatisticamente significativa entre a

gravidade da coreia, a intensidade das alterações dos movimentos conjugados oculares e da bradicinésia. Os resultado referidos por Young e col. (1986)[266] e Penney e col. (1990)[185], em estudos conduzidos em áreas endémicas de doença de Huntington e que envolveram algumas dezenas (65-128) de indivíduos afectados, indicam que a evolução dos sintomas é progressiva ao longo do tempo. Estes resultados não estão de acordo com a não correlação entre a intensidade da coreia e o tempo de evolução da doença (embora o valor de *r* se aproximasse do significado estatistico). O facto de o número de doentes ser relativamente pequeno e heterogéneo pode justificar este resultado. A não observação de correlação estreita entre a intensidade da bradicinésia e o tempo de evolução no grupo de doentes estudado pode, muito provavelmente, dever-se ao facto de a bradicinésia surgir apenas quando certas populações neuroniais do estriado são atingidas[1]. Por outro lado, nos doentes avaliados mais que uma vez, observou-se um agravamento de todos os parâmetros avaliados, com excepção da bradicinésia no doente H7. Este facto sugere que a bradicinésia possa constituir um aspecto de certas formas de apresentação de doença, nomeadamente de início precoce. De facto, dos 5 doentes que iniciaram os sintomas da doença na terceira década da vida, em 4 a bradicinésia era notória, o que vem traduzido na correlação significativa entre esta alteração motora e a idade de início da doença.

A deterioração cognitiva na doença de Huntington, pelo menos nas fases iniciais, pode considerar-se como uma das formas "sub-cortical" de demência[34,210]. Nos doentes estudados, era evidente

uma preservação relativa da linguagem e da orientação alopsíquica e mesmo heteropsíquica em estadios adiantados da doença. A demência, tal como as alterações dos movimentos conjugados oculares e dos movimentos incluídos na escala de incapacidade motora, parece depender do grau de lesão das estruturas estriatais[8,23,235]. De facto verificou-se existir uma correlação estatisticamente significativa entre a pontuação obtida na "MMSE" e estes dois parâmetros motores.

Estudo das monoaminas no LCR

O estudo da função dos sistemas dopaminérgicos cerebrais na doença de Huntington, como já antes se referiu, é ainda hoje um tema controverso. A avaliação neuroquímica da transmissão dopaminérgica cerebral nesta situação tem-se baseado na quantificação das concentrações da dopamina no tecido cerebral obtido por necrópsia ou na determinação das concentrações de um dos principais metabolitos da dopamina, o HVA, no tecido cerebral ou no LCR de indivíduos afectados. Como já foi referido, esta metodologia não tem ajudado a elucidar as dúvidas existentes.

No presente estudo, a avaliação do estado da transmissão dopaminérgica cerebral em doentes com o diagnóstico clínico de doença de Huntington foi realizada através da quantificação das concentrações da dopamina e de dois dos seus principais metabolitos, o DOPAC e o HVA, no LCR, dado não se ter conseguido quantificar 3-MT em nenhuma das amostras estudadas.

No LCR de indivíduos com doença de Huntington e nos que constituiram o grupo testemunha o HVA era o composto que apresentava concentrações mais elevadas, como habitualmente se verifica[15]. Ao analisar os resultados da determinação das concentrações dos metabolitos da dopamina e da própria amina no LCR do grupo de indivíduos afectados de doença de Huntington, verificou-se que as concentrações do HVA eram idênticas às observadas no grupo testemunha, tal como já diversos autores haviam referido[128,136]. Estes resultados, por si só, não constituem prova definitiva em favor de uma normal transmissão dopaminérgica cerebral neste grupo de doentes; na verdade, as concentrações do HVA poderão não ser o melhor meio para a avaliação da actividade dos neurónios dopaminérgicos cerebrais. Com efeito e porque o HVA é produto final do metabolismo da dopamina, as concentrações deste dependem da integridade funcional de uma cadeia enzimática, em que participam a MAO e a COMT, e não somente das quantidades de dopamina disponíveis para serem metabolizadas[132]. Desta forma, para que se possa ter um conhecimento mais completo da integridade funcional dos sistemas metabólicos da dopamina na doença de Huntington, é necessário determinar as concentrações dos compostos que dão origem ao HVA, nomeadamente do DOPAC, da 3-MT e da própria dopamina. No presente trabalho somente foi possível detectar, além do HVA, o DOPAC e a dopamina. No grupo de doentes estudado as concentrações do DOPAC no LCR encontravam-se sistemática e consistentemente aumentadas. As concentrações deste metabolito da dopamina no LCR do grupo de doentes eram cerca de 14 vezes

superiores às observadas no LCR dos indivíduos do grupo testemunha. Da mesma forma, foi possível detectar dopamina no LCR da maioria dos doentes avaliados em concentrações muito superiores à observada nos 2 únicos indivíduos do grupo testemunha nos quais foi possível quantificar a amina.

Desta forma, os resultados agora discutidos indicam o que se segue:

- **tanto os níveis de dopamina como os de DOPAC no LCR do grupo de doentes são significativamente superiores aos quantificados no LCR do grupo testemunha;**

- **no grupo de pacientes com doença de Huntington, existe hiperactividade dos sistemas dopaminérgicos cerebrais:**

- **de entre os metabolitos da dopamina, o DOPAC poderá ser aquele que melhor reflecte o estado de activação das vias dopaminérgicas cerebrais nesta situação;**

- **na avaliação neuroquímica da actividade dopaminérgica cerebral, nomeadamente realizada por quantificação de neurotransmissores e seus metabolitos no LCR, é necessário utilizar mais que um indicador para que as conclusões tiradas possam ser válidas.**

O facto de somente se encontrarem elevadas as concentrações

da dopamina e do DOPAC, sem aparente modificação das concentrações do HVA, sugere a presença de uma ruptura na integridade funcional da cadeia metabólica da dopamina nesta situação. Os argumentos invocados em favor desta sugestão são circunstanciais e não permitem afirmar a presença de uma diminuição da actividade da COMT. Com efeito, tem sido sugerido, em estudos da actividade da COMT em tecidos cerebrais obtidos por necrópsia, que a actividade desta enzima na doença de Huntington não estaria afectada[124]. Por outro lado, verificou-se, no modelo experimental de doença de Huntington induzido pelo ácido caínico, elevação da actividade da COMT[203]. Uma razão apontada é a de que este aumento da actividade metilante resulta da "gliose" secundária às lesões cerebrais induzidas pelo ácido caínico[124,203]. Com efeito, a actividade de O-metilação no SNC encontra-se quase exclusivamente distribuída às células da glia[121,124]. Apesar de ter sido mencionada a presença de *gliose* no cérebro de indivíduos coreicos[37], mais recentemente tem-se mencionado que esta é apenas aparente[206], resultando essencialmente de uma diminuição da relação neurónio/astrócito em consequência de elevada perda neuronial[139]. Desta forma a determinação da actividade da COMT (expressa por unidade de peso de tecido) em tecidos cerebrais nos quais existe uma diminuição da relação neurónio/astrócito poderá resultar numa aparente elevação ou não modificação da actividade metilante. Seja como for, a verdade é que a "gliose" real ou aparente, dos doentes coreicos, tenderia a facilitar a metilação do DOPAC. Esta circunstância reforça indiscutivelmente o significado que se possa atribuir aos resultados que obtivemos com o doseamento do DOPAC

e do HVA. Discutiremos mais adiante estes resultados, no entanto, apesar da falta de dados mais precisos, parece desde já legítimo aceitar que as elevadas concentrações de DOPAC, em contraste com as baixas concentrações do HVA sugerem que:

- **na doença de Huntington a metilação do DOPAC e consequente formação do HVA possam estar diminuidas.**

A questão da integridade dos neurónios noradrenérgicos na doença de Huntington é também tema de alguma controvérsia. Spokes (1980)[231], num dos poucos estudos sobre a transmissão noradrenérgica central na doença de Huntington, referiu haver elevação das concentrações tecidulares de noradrenalina no núcleo caudado, no globo pálido lateral e na pars reticulata da substância negra; contudo, Bernheimer e Hornykiewicz (1973)[25] numa reduzida série de amostras de tecido cerebral referem não haver modificação significativa das concentrações tecidulares de noradrenalina em várias áreas cerebrais. O principal metabolito da noradrenalina no SNC é o MHPG; as concentrações deste metabolito da noradrenalina no LCR correlacionam-se estreitamente com o contéudo tecidular de MHPG em várias áreas cerebrais[78] e parecem reflectir, em certa medida, a actividade da transmissão noradrenérgica cerebral[26,57,133]. Contudo, não se pode excluir a contribuição parcial do sistema simpático periférico, pois os níveis plasmáticos de MHPG podem influenciar os níveis deste metabolito no LCR[132]. No grupo de doentes por nós estudado, as concentrações

de noradrenalina, MHPG e a razão MHPG/noradrenalina eram idênticas às observadas no grupo testemunha. Apesar das reservas anteriormente expostas, estes resultados justificam a sugestão de que:

- na doença de Huntington não há alteração da actividade dos neurónios noradrenérgicos.

Na doença de Huntington, as concentrações tecidulares de 5-hidroxitriptamina no cérebro são, segundo alguns autores, idênticas às presentes nos indivíduos de controlo[25], enquanto outros sugerem a presença de concentrações elevadas desta amina no cérebro de doentes coreicos[126,201]. Nos nossos doentes as concentrações do 5-HIAA no LCR eram idênticas às observadas no LCR dos indivíduos do grupo testemunha, tal como alguns autores haviam referido[48,64,94,135]. Tendo em mente que o 5-HIAA não é um índice de libertação mas muito provavelmente de síntese de 5-hidroxitriptamina parece, pois, aceitável sugerir que:

- na doença de Huntington não há alteração da actividade dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos.

Estudo clínico *versus* doseamento de monoaminas no LCR

No presente estudo não se verificou qualquer tipo de correlação entre o grau de incapacidade funcional e os níveis de monoaminas (dopamina ou noradrenalina) e respectivos metabolitos

no LCR. O facto de a incapacidade funcional na doença de Huntington se acompanhar de acentuado hipometabolismo no estriado[265] sugere a perda de uma população neuronial não monaminérgica[188].

Classicamente, a coreia e a bradicinésia são as alterações motoras que mais directamente se relacionam com o estado da actividade dopaminérgica cerebral. A relação da bradicinésia com o déficit na transmissão dopaminérgica é bem evidenciada na doença de Parkinson[11]. Em contraste com isto, na coreia da doença de Huntington ou de outras situações clínicas, o tratamento da coreia assenta na utilização de fármacos com actividade antidopaminérgica[39,170].

No grupo de doentes estudado, não se verificou a presença de qualquer tipo de corrrelação entre a intensidade da coreia ou da bradicinésia e as concentrações de qualquer uma das monaminas ou respectivos metabolitos no LCR, à excepção do HVA. Com efeito, observou-se uma correlação negativa entre as concentrações no LCR deste metabolito da dopamina e a intensidade da bradicinésia. Ao contrário do verificado para o HVA, não se observou diferença significativa nas concentrações de DOPAC no LCR entre indivíduos com formas de doença em que predominava a coreia ou a bradicinésia. Acresce ainda referir que a relação HVA/DOPAC, apontada como traduzindo a actividade da COMT, era significativamente inferior em doentes nos quais predominava a bradicinésia. Estes resultados sugerem uma elevação da formação do DOPAC na doença de Huntington assim como uma diminuição

da metilação do próprio DOPAC em HVA. A elevação da formação do DOPAC acredita-se que possa ocorrer somente em situações de aumento de aporte do substracto, a dopamina, e não em consequência de uma aumento da actividade da MAO[125]. Contudo convém não esquecer que a elevação das concentrações de DOPAC poderá igualmente ocorrer em circunstâncias em que exista uma diminuição da respectiva metilação em HVA[167]. Contudo, uma eventual deficiência na metilação do DOPAC não parece ser a única razão pela qual o DOPAC se encontra elevado no grupo de doentes estudado, visto que, a par desta elevação, foi possível igualmente observar elevação dos níveis da dopamina no LCR. Com efeito, apenas no LCR de dois indíviduos do grupo testemunha foi possível quantificar dopamina, em valores muito próximos do limite de detecção do método, enquanto que em 9 dos 11 doentes estudados as concentrações da dopamina no LCR eram cerca de 10 vezes superiores às observadas no LCR dos dois únicos indivíduos testemunha nos quais se conseguiu detectar dopamina. Um outro argumento em favor da presença de hiperactividade dopaminérgica é o de a soma das concentrações no LCR dos dois metabolitos principais da dopamina (DOPAC e HVA) ser significativamente maior no LCR dos indivíduos afectados de doença de Huntington do que no grupo testemunha.

A normalidade das concentrações de HVA numa situação em que a formação da DOPAC está aumentada sugere fortemente uma alteração da metilação. Como já referido anteriormente existem argumentos circunstanciais a favor desta possibilidade, contudo, argumentos, igualmente circunstanciais, poderão ser invocados em

favor da sugestão de uma real diminuição da actividade metilante no cérebro dos doentes afectados de doença de Huntington com base nos nossos resultados, pois:

- **se verificou a existência de uma correlação negativa entre a bradicinésia e os níveis de HVA,**

- **e os níveis de HVA no LCR e a relação HVA/DOPAC foram ainda menores no grupo de doentes em que predomina a bradicinésia.**

Estas sugestões são ainda reforçadas pelo facto de os doentes mais bradicinéticos serem os que caracteristicamente apresentam maior perda celular, inclusivé no que se refere ao número de células gliais[168,169]. De facto os nossos doentes que apresentaram manifestações clínicas com idade de início mais precoce também apresentavam concentrações de HVA mais baixas, conforme expresso na correlação entre entre estes dois parâmetros.

Os doentes mais bradicinéticos, como já acima se referiu, são os que apresentam mais baixos níveis de HVA no LCR, apesar de as concentrações da dopamina e do DOPAC, o metabolito precursor do HVA, serem idênticas às observadas nos doentes com formas predominantemente coreicas. Assim, para além das alterações neuroquímicas da transmissão dopaminérgica, evidenciáveis através de um aumento da formação da dopamina, que afectam os doentes com formas de doença predominantemente coreicas ou bradicinéticas, nesta última parece ser possível confirmar a sugestão

já atrás feita da presença de um déficit dos mecanismos de metilação do DOPAC. Esta perturbação da metilação parece não afectar somente os indivíduos com formas mais bradicinéticas de doença, mas também indivíduos com formas de doença predominantemente coreica, como se evidencia pela diminuição da relação HVA/DOPAC quando comparada com a presente no grupo de controlo.

Nos doentes H3 (2ª observação), H4 e H7 as concentrações do 5-HIAA encontravam-se muito reduzidas, o que poderá eventualmente ter relação com a sintomatologia depressiva que afectou 2 dos 3 doentes referidos. De facto, tem sido descrita diminuição das concentrações do 5-HIAA no LCR de doentes deprimidos[242]; contudo, Kurlan e col. (1988a)[135] verificaram não existir diferença significativa nas concentrações do 5-HIAA no LCR entre coreicos deprimidos e não deprimidos. A redução das concentrações de 5-HIAA ocasionalmente observada em 3 dos nossos doentes não invalida, pois, a assunção de que na doença de Huntington não há alteração dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos.

<u>Em conclusão</u>:

- **do nosso estudo da série de doentes afectados de doença de Huntington, assume primordial significado, a par de outros aspectos também discutidos, a sugestão de que esta situação se**

acompanha de hiperactividade dopaminérgica cerebral, para cuja avaliação os níveis de dopamina e DOPAC no LCR se afiguram como os indicadores mais adequados.

IV-Discussão Geral
e
Conclusões

O principal objectivo deste trabalho foi procurar esclarecer o estado da transmissão dopaminérgica cerebral na doença de Huntington. Dado que os indicadores utilizados até à data não tinham dado uma resposta capaz a este propósito, entendeu-se ser essencial proceder a estudos que pudessem esclarecer este aspecto nesta situação patológica. Por essa razão, procedemos a um estudo mais completo da transmissão dopaminérgica cerebral de doentes afectados de doença de Huntington através do quantificação das concentrações de dopamina e dos seus três metabolitos principais (DOPAC, 3-MT e HVA) no LCR de doentes afectados de doença de Huntington.

Como os resultados preliminares deste estudo indicavam que o DOPAC estava sistemática e significativamente aumentado[226] e como surgiram recentemente dúvidas acerca do valor do DOPAC[196,225,267], como indicador da libertação da dopamina procedemos também a estudos, no animal, com a finalidade de esclarecer este aspecto. Pelas razões já apontadas anteriormente procedemos também ao estudo da transmissão noradrenérgica e 5-hidroxitriptaminérgica através da quantificação da noradrenalina e 5-hidroxitriptamina e respectivos metabolitos, o MPHG e o 5-HIAA. Por razões semelhantes às referidas em relação oa DOPAC procedemos também a um estudo experimental com o objectivo de verificar qual a origem do 5-HIAA.

No primeiro capítulo, descrevem-se os estudos experimentais realizados no animal, com o objectivo de determinar qual a fracção de dopamina e de 5-hidroxitriptamina que constituem a principal fonte para a formação do DOPAC e 5-HIAA respectivamente.

No segundo capítulo, são apresentadas as investigações de quantificação da dopamina, noradrenalina e 5-hidroxitriptamina e respectivos metabilitos no LCR de pacientes afectados de doença de Huntington.

Como já anteriormente foi discutido estes estudos permitem indicar que:

- No Rato, o DOPAC e o 5-HIAA são metabolitos que se formam de aminas recém-sintetizadas e antes que a sua libertação tenha ocorrido e por essa razão deverão ser considerados indicadores adequados da taxa de formação das respectivas amina.

- No grupo de doentes estudados sugere-se a presença de hiperactividade dopaminérgica, com base no aumento significativo das concentrações de dopamina e DOPAC na maioria das amostras de LCR provenientes deste grupo de doentes e normalidade da transmissão noradrenérgica e 5-hidroxitriptaminérgica, com base nos níveis de noradrenalina, MPHG e 5-HIAA no LCR dos doentes estudados que não são diferentes dos determinados no grupo testemunha.

Os estudos experimentais permitiram pois esclarecer qual o significado do aumento das concentrações de DOPAC e 5-HIAA

no LCR do grupo de doentes estudado. Este resultado, ao mostrar exagero de síntese nos neurónios dopaminérgicos cerebrais de doentes afectados de doença de Huntington indicavam que estes neurónios estavam hiperactivos. O facto de não ter sido possível quantificar 3-MT em nenhuma das amostras analizadas, o que não admira pois este é um metabolito da dopamina que se forma em quantidades pequenas (cerca de 70 vezes menos que o DOPAC)[263], não permitiu ter informações seguras a propósito da libertação de dopamina cerebral nesta situação. O aumento das concentrações de dopamina livre no LCR dos mesmos doentes são um resultado a favor desta hipótese. Existem também na literatura indícios que sugerem fortemente que, tanto no sistema nervoso central como periférico, as aminas de formação recente são as que preferencialmente são libertadas durante a activação nervosa[104,196,197,227,228].

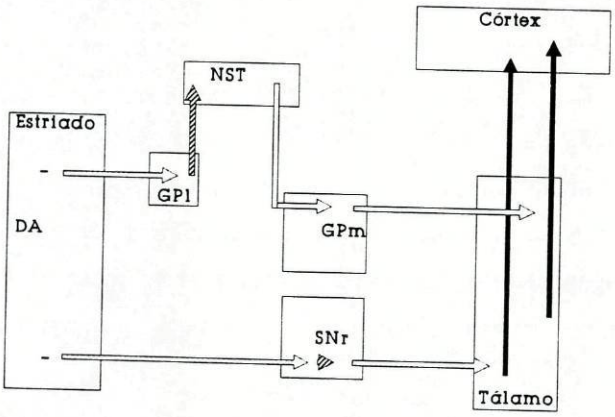
O papel que o aumento da transmissão dopaminérgica pode ter nesta afecção é um tema controverso, tanto mais que a complexidade da acção deste mediador no funcionamento dos gânglios da base não está em muitos aspectos esclarecida. Na patogenia da doença de Huntington, o facto mais notório é sem dúvida a perda de neurónios de projecção do estriado, com particular relevância para os neurónios que se projectam no globo pálido lateral e substância negra reticular[1,206]. Diversos estudos têm realçado a relação entre a perda destes neurónios e a génese dos sinais clínicos. De facto, existe uma correlação estreita entre as diversas perturbações motoras e cognitivas da doença quer com o grau de atrofia do

estriado, determinada por exame histológico ou por tomografia computorizada cerebral[1,8,169,229], quer com a redução do metabolismo nesta mesma estrutura, determinada por TEP[23,265]. Desta forma, pareceria previsível que variações da transmissão dopaminérgica cerebral não se revelassem de importância numa doença em que a principal alteração se localiza precisamente nos neurónios sobre os quais a dopamina vai actuar. Procuraremos demonstrar que não é assim.

De acordo com as teorias mais recentes e de uma forma muito esquemática, o funcionamento dos gânglios da base realiza-se por circuitos paralelos topográfica e talvez funcionalmente independentes, de forma a que alguns circuitos são activados enquanto que outros são inibidos[4,49,162].Estudos electrofisiológicos têm mostrado que os neurónios do globo pálido medial e da substância negra reticular estão tonicamente activos[49]. Desta forma seria possível que a inibição de alguns destes provocasse uma activação dos neurónios tálamo-corticais, promovendo, por exemplo, a execução de programas motores, enquanto que o reforço da inibição de outros anulasse programas "motores irrelevantes"[2,46]. O estriado, local de recepção de todas as influências corticais e subcorticais, é muito provavelmente a estrutura dos gânglios da base onde os processos de desinibição ou de reforço da inibição acima citados vão ser determinados. Com o objectivo de compreender a forma como estes processos decorrem, uma particular atenção tem sido focada na interacção entre o glutamato (cuja acção é amplificada pelos interneurónios colinérgicos) e a dopamina sobre os

neurónios gabaérgicos que se projectam do estriado para a substância negra e globo pálido[46,89]. A complexidade da função do estriado é bem evidenciada pela sua estrutura heterogénea, com áreas histoquimicamente diferentes, que poderão corresponder a uma diversidade de função dos diversos neurónios de projecção e interneurónios[2,90]. Diversos estudos, utilizando diferentes metodologias, têm levado a conclusões controversas em relação à acção da dopamina sobre os neurónios do estriado[1,3,46]. Os estudos sobre a doença de Parkinson e os modelos experimentais desta, induzidos pela destruição da via nigro-estriada, tanto pela injecção intracerebral de 6-hidroxidopamina (6-OHDA) como pela administração de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), têm mostrado que a acção da dopamina no estriado é essencial na função destas estruturas subcorticais[29,36,45,123]. Estes modelos experimentais indicam que a acção global da dopamina sobre o estriado induz a activação dos neurónios tálamo-corticais. Porém, o tipo de efeito (excitatório ou inibitório) que a dopamina exerce sobre estes neurónios[2,46] e qual a influência que a activação dos diversos tipos de receptores da dopamina (D1 e D2) tem é ainda um ponto muito mal esclarecido[32,51,69,243], tanto mais que se supõe existirem subtipos de receptores D2 e provavelmente receptores D3[12,69]. Alguns autores[46], com base em resultados de estudos utilizando como metodologia o antagonismo do sub-tipo NDMA de receptores para o glutamato, defendem a teoria de que a dopamina e o glutamato exercem acções contrárias sobre os neurónios do estriado (inibitória e excitatória, respectivamente). Para estes autores a ansa cortico-estriado-tálamo-cortical funcionaria essencialmente

como um circuito de retro-inibição com a função específica de protecção do córtex do excesso de informação; a dopamina teria como função a activação destes circuitos (ver esquema 3)[46].

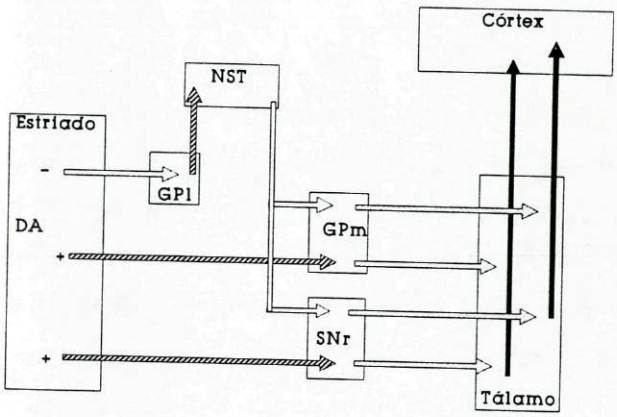


Esquema 3. Efeito da dopamina (DA) no estriado, segundo Carlsson e Carlsson (1990). A dopamina inibe os neurónios gabaérgicos de projecção do estriado que se projectam no globo pálido lateral (GPl). Esta inibição provoca desinibição dos neurónios gabaérgicos que se projectam desta estrutura para o núcleo sub-tâlamico (NST) inibido a projecção glutamatérgica desta estrutura para o globo pálido medial (GPm). Este acontecimento tem como consequência a não promoção dos neurónios gabaérgicos palido-tâlamicos com consequente desinibição do tálamo. Por sua vez a inibição dos neurónios que se projectam na substância negra reticular (SNr), através de um interneurónio neurónio, inibe os neurónios palido-tâlamicos. Neurónios inibitórios gabaérgicos - setas ponteadas= inibição, setas tracejadas= desinibição; neurónios excitatórios glutamatérgicos - setas em aberto= inibição, setas a cheio= desinibição.

Segundo estes autores a activação dos neurónios do estriado pelo glutamato libertado pelos neurónios cortico-estriados induzem uma inibição do tálamo, tanto através da via directa como da indirecta (via núcleo sub-tâlamico). A desinibição do tálamo está na dependência da activação dos receptores da dopamina pela amina libertada fasicamente pelos neurónios meso-estriados[134], provavelmente sob controlo cortical[67].

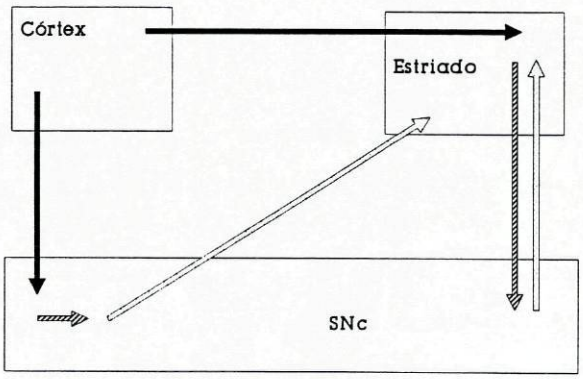
Para outros autores, esta ansa seria exactamente o contrário, um circuito de retro-acção reforçado pela dopamina, o que pressupõe que o glutamato e a dopamina activariam no mesmo sentido os neurónios alvo[2]. Neste caso, a via directa e indirecta tem uma acção diferente sobre o tálamo. A activação dos receptores para o glutamato provocaria uma desnibição dos neurónios tálamo-corticais pela via directa e promaveria um reforço da inibição tónica dos mesmos neurónios pela via indirecta. A activação dos receptores para a dopamina, ao contrário do glutamato, provocaria desinibição do tálamo através das duas vias. Esta hipótese baseia-se em estudos nos quais a acção da dopamina é determinada através da modificações da síntese dos co-mediadores dos neurónios do estriado[90] ou através da modificação do consumo de glicose determinada por TEP nestes mesmos neurónios[243], sugerindo-se que a dopamina teria uma acção excitatória sobre os neurónios que se projectam no substância negra e inibitória sobre os que se projectam sobre o globo pálido lateral (ver esquema 4). Segundo o esquema proposto por estes autores, a desinibição e o reforço da inibição dos neurónios do globo pálido e substância negra realizar-se-ía pela acção diferente da dopamina sobre as chamadas vias directa

(substância negra reticular e globo pálido medial) e indirecta (globo pálido lateral, núcleo subtâlamico).



Esquema 4. Efeito da dopamina (DA) no estriado, segundo Albin e col. (1989). A dopamina inibe os neurónios gabaérgicos de projecção do estriado que se projectam no globo pálido lateral (GPl). Esta inibição provoca desinibição dos neurónios gabaérgicos que se projectam desta estrutura para o núcleo sub-tâlamico (NST) inibido a projecção glutamatérgica desta estrutura para o globo pálido medial (GPm). Este acontecimento tem como consequência a não promoção dos neurónios gabaérgicos palido-tâlamicos com consequente desinibição do tálamo. Por sua vez a activação dos neurónios que se projectam na substância negra reticular (SNr) inibe os neurónios palido-tâlamicos. Neurónios inibitórios gabaérgicos - setas ponteadas= inibição, setas tracejadas= desinibição; neurónios excitatórios glutamatérgicos - setas em aberto= inibição, setas a cheio= desinibição.

Seja de que maneira fôr, não existem dúvidas a propósito do papel fulcral que dopamina exerce sobre o funcionamento destes circuitos, quer seja através de uma acção independente[46], quer através da modulação do efeito da activação do glutamato sobre o mesmo neurónio alvo[224], o que pressupõe um controlo cortical da actividade da via meso-estriada. Esta via funciona provalvelmente de uma forma fásica[134] e admite-se que é regulada pelo córtex, indirectamente através de uma subdivisão do estriado (os estriossomas)[90,134] e/ou directamente através de uma via cortico-nígrica, conforme sugerido pelos resultados de experiências nas quais se injectaram inibidores NMDA na substância negra compacta[67,146] (ver esquema 5).



Esquema 5. Controlo da actividade dos neurónios dopaminérgicos da substância negra compacta (SNc). Directamente por uma via cortico-nígrica (exigindo um interneurónio gabaérgico interposto) ou indirectamente através dos estriossomas; a activação dos neurónios gabaérgicos do estriado, que se projectam na SNc, provoca uma inibição dos neurónios dopaminérgicos nigro-estriados. Neurónios inibitórios gabaérgicos - setas tracejadas; neurónios excitatórios glutamatérgicos - setas a cheio; neurónios dopaminérgicos - setas ponteadas.

A doença de Huntington, como já referido, manifesta-se por alterações motoras, cognitivas e emocionais, todas provavelmente devidas à lesão dos neurónios de projecção do estriado.

As alterações cognitivas nesta afecção, e como já referido anteriormente, parecem relacionar-se essencialmente com a perturbação dos gânglios da base, segundo sugerem diferentes estudos anatmopatológicos[229], neuroradiológicos[8,23,235] e neuropsicológicos[114,158,166,209]. Este tema, contudo, não é pacífico, pois alguns autores defendem estar a demência relacionada com perturbações corticais, essencialmente frontais; baseiam-se para tal no facto de (1) existirem semelhanças entre a demência da doença de Huntington e a do lobo frontal[259], (2) observar-se perda neuronial no córtex frontal[193], (3) existir correlação entre o fluxo sanguíneo cortical pré-frontal[251] e (4) recentemente se ter encontrado também correlação com o hipometabolismo cortical determinado por TEP[138].

No grupo de doentes estudados verificou-se que a pontuação do "MMSE" se correlacionou de forma mais estreita com o grau de perturbação dos movimentos conjugados oculares ($P < 0,01$) do que com as outras subdivisões do exame neurológico quantitativo ($P < 0,05$); estes resultados ajustam-se bem com os resultados do estudo de Kuwert e col. (1991)[138] ao verificar-se, também, correlação entre a gravidade da demência e a redução do metabolismo do caudado. De facto, diversos estudos que sugerem que as funções cognitivas e os movimentos conjugados dos olhos dependem mais das alterações do caudado e as alterações locomotoras mais do putámen[36,89,141,235]. Uma relação entre deterioração cognitiva com a

actividade aminérgica cerebral tem sido procurada por vários autores em diversas situações patológicas que provocam demência[30,153,165,253]. Na doença de Parkinson os resultados obtidos têm sido controversos[61,240] e na doença do Huntington não encontramos referências a este respeito. No grupo de doentes estudado verificamos não existir correlação entre os níveis de dopamina, DOPAC e HVA e a pontuação obtida no "MMSE", o que sugere estar a deterioração cognitiva relacionada com factos independentes dos mecanismos dopaminérgicos cerebrais, apesar de terem sido referidas, embora não de forma clara, agravamento da deterioração cognitiva após a administração de fármacos antagonistas dopaminérgicos à semelhança do que se havia observado em relação às alterações motoras de tipo parkinsónico[87,220].

Os aspectos psiquiátricos da doença de Huntington, embora possam contituir um problema grave no quadro clínico destes doentes, são talvez os sinais clínicos da doença de Huntington menos esclarecidos. Alterações subtis de personalidade ou do comportamento social são vulgarmente referidas anos antes do início dos sintomas motores da doença e refere-se que as mães são muitas vezes capazes de reconhecer quais os filhos que vão ter a doença, o que nunca foi conseguido pelos neuropsicologistas[39]. São escassos os estudos realizados em grandes séries de forma a se determinar de facto qual o tipo de alterações psiquiátricas, qual a sua incidência e qual a sua evolução. Nestes poucos estudos é descrita uma enorme variedade de síndromes psiquiátricos, desde alterações do afecto, da personalidade, do humor com características mais ou menos típicas

dos síndromes psiquiátricos clássicos[43]. Até que ponto muitas destas perturbações são reactivas, fazem parte do quadro demencial ou se relacionam com as alterações estruturais do SNC próprias da doença é uma interrogação ainda não completamente esclarecida[39]. Em lesões confinadas ao caudado ou ao putamen têm sido descritos diversos tipos de alterações, tais como apatia, inércia, perda de interesse, desinibição e impulsividade com deterioração do comportamento social, depressão, doença maníaco-depressiva, comportamentos psicóticos com ilusões e alucinações e comportamentos obsessivo-compulsivos[140,158]; constituem um argumento em favor da possibilidade de, na doença de Huntington, as alterações psiquiátricas se relacionarem com a lesão do estriado. No que diz respeito às alterações afectivas, tem sido sugerido poderem ser um dos aspectos da sua heterogeneidade fenotípica, dado surgirem com maior incidência em determinadas famílias[82]. A relação entre, esquizofrenia e hiperactividade dopaminérgica e/ou deficiência glutamatérgica ajusta-se bem ao que poderá acontecer na doença de Huntington[190]. Em relação à depressão não se tem encontrado uma relação estrita com deficiência de 5-hidroxiptriptamina[135] e não se conhece relação com as concentrações de dopamina ou noradrenalina[151]. No grupo de doentes estudado apenas em dois casos apresentavam sinais clínicos compatíveis com depressão na altura da colheita do LCR (correspondente a 3 avaliações), e apresentavam concentracões de 5-HIAA extremamente baixas; o facto da série ser pequena não permite qualquer conclusão.

As alterações motoras na doença de Huntington são as manifestações de distúrbio dos gânglios da base melhor estudadas. Apresentam aspectos semelhantes aos observados na doença de Parkinson: bradicinésia[239], incapacidade na realização de movimentos rápidos[102], certos aspectos das alterações da marcha[131] e das alterações dos movimentos conjugados oculares [141]. Se de facto se considerar que os neurónios gabaérgicos do estriado medeiam as acções dopaminérgicas meso-estriadas[219], será de prever que parte da sintomatologia possa ser comum às duas situações, seja qual fôr o efeito da activação dos diferentes receptores para a dopamina.

A coreia, aspecto não observado na doença de Parkinson (excepto como complicação da terapêutica), é sem dúvida a perturbação motora mais característica da doença de Huntington e cuja génese tem sido relacionada com a hiperactividade dopaminérgica, talvez porque os neurolépticos continuam a ser os fármacos de eleição no tratamento sintomático deste sinal clínico, seja qual for a sua etiologia[178].

De facto, a maioria dos modelos experimentais discinéticos, nos quais a coreia é sinal importante, baseiam-se na administração de agonistas dopaminérgicos em animais nos quais foi provocada lesão da via nigro-estriada, quer pela 6-hidroxidopamina (6-OHDA), quer pelo MPTP[31,175]. Nestes modelos, o aparecimento da coreia tem sido relacionado com um exagero da actividade dopaminérgica sobre os neurónios gaba/encefalinérgicos e/ou a alteração na relação entre os receptores D1 e D2[32,51,52,243].

Contudo, quando se analisam os dados existentes sobre coreia verifica-se que a sua etiopatogenia contínua a ser desconhecida.

Lesões do núcleo sub-tâlamico, quer provocadas por doença no Homem[88,181], quer em modelos experimentais provocados no animal por destruição do referido núcleo[98] chamaram a atenção para a importância desta estrutura na génese da coreia. Os estudos realizados por Crossmann e col. (1988)[59] e Mitchell e col., (1989)[163] no macaco mostram que o local de acção da injecção de bicuculina (antagonista gabaérgico) responsável por coreia seria o globo pálido lateral. Os resultados deste grupo de autores sugeriam pois que a inibição da activação dos receptores dos neurónios gabaérgicos que se projectam do globo pálido lateral para o núcleo sub-talâmico provocaria uma inibição deste núcleo que desta forma não activaria a inibição do tálamo (ver esquema 3 e 4). Os resultados dos diversos estudos sugerem que a génese da coreia se possa relacionar com uma perda da activação essencialmente do globo pálido medial[163] pelos neurónios que se projectam do núcleo sub-tâlamico sobre estas estruturas[2]. Este facto pode ocorrer por destruição do referido núcleo e/ou as suas projecções ou por excesso de inibição. Este segundo mecanismo ocorre quando a projecção do estriado sobre o globo pálido lateral se encontra lesada ou é inibida. Na doença de Huntington, os primeiros neurónios a desaparecer são precisamente os gaba/encefalinérgicos que se projectam no globo pálido lateral[1]. Este facto poderia explicar a desinibição dos neurónios que se projectam do globo pálido lateral para o núcleo sub-tâlamico e por consequência a inibição deste último. Contudo, nos diversos modelos experimentais de doença de Huntington, apesar de apresentarem quadros patológicos e neuroquímicos mais ou menos sobreponíveis a esta doença, a coreia não se manifesta[119,154], tal

como já se tinha verificado nas lesões destrutivas do estriado[72]. Este facto parece sugerir que a perda destes neurónios por si só não induz coreia. Recentemente, experiências realizadas no macaco e no babuíno demonstraram que no modelo experimental de doença de Huntington, no qual a lesão do estriado foi provocada pelo ácido caínico, a coreia apenas surgia quando se administrava l-dopa[119]. Os resultados destas experiências poderão sugerir que, a par da lesão do estriado, é necessário um aumento da actividade dopaminérgica para que a coreia possa surgir. Esta sugestão ajusta-se bem aos resultados obtidos por nós na quantificação de dopamina e seus metabolitos "major" no LCR de doentes afectados de doença de Huntington, nos quais se observa aumento das concentrações do DOPAC (e da soma DOPAC+HVA) e da dopamina compatíveis com a presença de hiperactividade dopaminérgica, o que combina bem com a melhoria sintomática observada com a terapêutica da doença de Huntington com depletores neuroniais aminérgicos ou antagonistas dos receptores para a dopamina, ao melhorarem a coreia e agravarem as outras perturbações motoras[87,220]. Com base nestes resultados poder-se-á sugerir que, na doença de Huntington, é necessário a activação pela dopamina dos receptores dopaminérgicos dos neurónios gaba/encefalinérgicos sobreviventes para que a coreia se possa expressar. Tudo indica que a perda funcional do núcleo sub-tâlamico, provocada pela sua inibição exagerada, vá permitir que "programas motores irrelevantes" se expressem sob a forma de coreia. Para além deste conjunto de provas circunstanciais os resultados dos estudos sobre os efeitos da activação diferencial de receptores D1 e D2 para a dopamina em

modelos experimentais de doença de Parkinson, ao mostrarem a indução de discinésias com a l-dopa e com os agonistas D2 e ao mostrarem um aumento do consumo de glicose no núcleo sub-tâlamico e no globo pálido medial[32,243], ajustam-se bem ao nosso ponto de vista. A activação dos receptores dos neurónios de projecção do estriado pela dopamina é também um factor importante na génese da coreia.

Para além da provável relação com a génese da coreia, existem outros factos a favor da possibilidade de aumento da transmissão dopaminérgica nesta doença. Em primeiro lugar, a principal alteração na doença de Huntington é constituída por perda dos neurónios espinhosos de tamanho médio que se projectam do estriado para o globo pálido e substância negra e que contêm GABA e substância P como principais mediadores, o que sugere uma perda de inibição dos neurónios dopaminérgicos nigro-estriados[46,147,148], embora estudos experimentais tendentes a comprovarem esta sugestão tenham fornecido resultados controversos[219]. Por outro lado, a influência glutamatérgica cortical sobre o sistema dopaminérgico é depressora[46], quer feita indirectamente através da activação dos neurónios gabaérgicos com origem nos estriossomas do estriado[90], quer seja feita directamente através de uma via glutamatérgica cortico-nígrica (com um interneurónio GABAérgico interposto)[46]. A perda de neurónios cortico-estriados, sugerida por alguns autores[206,262], provocaria um aumento da actividade dopaminérgica neste sistema, à semelhança do que acontece quando se administram antagonistas dos receptores

NMDA[67,146]. Finalmente, importa lembrar um facto conhecido na doença de Huntington; o aumento da actividade dos interneurónios NADPH-d positivos, que se encontram selectivamente preservados no estriado[5,18,22,80,81], que contêm somatostatina e neuropeptideo Y, conhecida a interacção entre a somatostatina e a dopamina[147], leva também a sugerir uma hiperactividade dopaminérgica.

Em resumo, os resultados referidos na parte clínica desta dissertação, apontando para uma hiperactividade dopaminérgica na doença de Huntington, ajustam-se:

- à possibilidade da génese da coreia depender não só da perda dos neurónios que se projectam na globo pálido lateral; para que a coreia ocorra é necessário também um exagero da activação dos receptores da dopamina,

- à desinibição da substância negra compacta por perda de neurónios estriado-nígricos,

- à possibilidade de deficiência glutamatérgica nesta doença

- e ao aumento das concentrações de somatostatina e de neuropetideo Y no estriado.

Os valores normais das concentrações de HVA no grupo de doentes estudados, à semelhança do observado pela maioria dos autores[128,136]. A normalidade ou a redução das concentrações de HVA

no LCR e no tecido cerebral de doentes afectados de doença da Huntington é um dos principais argumentos utilizados por alguns para negarem a existência de hiperactividade dopaminérgica nesta doença[44,60,64,233]. O HVA forma-se a partir do DOPAC ou da 3-MT; dado que, quantitativamente, o DOPAC é o metabolito cerebral mais importante, será natural inferir-se que uma parte quantitativamente importante do HVA provém da O-metilação do DOPAC.Desta forma, em condições normais, as variações do DOPAC e do HVA poderiam ter significado semelhante, conforme se pode inferir dos resultados das experiências atrás referidas. Os resultados dos estudos da formação e metabolização da dopamina, no Rato , descritas no capítulo 1, mostraram que a inibição da síntese e da desaminação da dopamina afectam de forma semelhante a formação do DOPAC e do HVA. Embora a perda de DOPAC fosse mais rápida e mais marcada que a do HVA, os resultados da 2ª e 3ª séries experimentais mostram que a fonte principal para a formação do HVA é o DOPAC. Desta forma, o facto da quantificação de HVA e DOPAC no LCR de doentes afectados de doença de Huntington ter revelado um aumento significativo de DOPAC não acompanhado de aumento igual do HVA, facto evidenciado pela diferença significativa da relação HVA/DOPAC, terá forçosamente que sugerir alteração da O-metilação. A causa desta redução da O-metilação do DOPAC em HVA poder-se-á relacionar uma redução da actividade da COMT[205]. A existência de correlação entre os níveis de HVA e parâmetros clínicos que se relacionam com a perda neuronial do estriado poderá sugerir uma redução da quantidade de enzíma disponível na área em causa, mas também não

se pode afastar a hipótese de alterações na funcionamento da glia poderem induzir esta redução. De facto, estudos da actividade monoaminoxidásica no cérebro de doentes de Huntington mostraram um aumento da actividade da MAO-B e normalidade da actividade da MAO-A[145], apontando para um aumento relativo da glia, pois apesar da localização dos dois tipos de MAO ser ainda um aspecto controverso, os estudos existentes vão no sentido de que a MAO-B se localize preponderantemente fora dos neurónios dopaminérgicos, tanto no Homem como em numerosas espécies animais[202]; nós próprios verificamos, no Rato, que a MAO-B não tem papel relevante no axoplasma neuronial. Contudo, o papel que a glia desempenha na transmissão neuronial, nomeadamente aminérgica, é ainda desconhecido, embora existam indícios de que possa ser importante[106]. O facto de não se conhecer este aspecto na doença de Huntington, não implica a exclusão da possibilidade de que alterações funcionais da glia possam a ser responsáveis pela redução na formação do HVA.

A influência dos neurónios 5-hidroxitriptaminérgicos e noradrenérgicos sobre os terminais dopaminérgicos no estriado é conhecida[47,108,204,252]. Por isso, quando se pretende avaliar a função dos sistemas dopaminérgicos cerebrais, é necessário ter em linha de conta a possível interacção que estes mediadores possam ter.

Nesta linha de pensamento é importante conhecer qual o estado a transmissão 5-hidroxitriptaminérgica e noradrenérgica na doença de Huntington, não só na interpretação das possíveis alterações da transmissão dopaminérgica, como também das

alterações cognitivas e psiquiátricas desta doença, dado que estes dois mediadores são importantes na patogénese destas manifestações[30,151,153]. No grupo de doentes estudados não se encontraram alterações das concentrações de 5-HIAA, MHPG e noradrenalina compatíveis com alteração da transmissão dos respectivos sistemas neuroniais, o que indica a sua integridade na doença de Huntington.

Conclusões gerais

Da série de estudos experimentais e clínicos realizados é possivel concluir que:

1) No cérebro de Rato:

- a quase totalidade do DOPAC se forma de dopamina que nunca foi libertada.

- no estriado, *nucleus accumbens* e córtex frontal de rato o DOPAC tem a sua origem em dopamina recém-sintetizada.

- a desaminação da dopamina nos terminais neuroniais dopaminérgicos localizados no estriado, *nucleus accumbens* e córtex frontal está essencialmente dependente da actividade da MAO-A.

- uma fracção considerável da 5-hidroxitriptamina recém-formada é desaminada em 5-HIAA.

Sendo assim, os resultados obtidos apoiam a proposta de que os níveis cerebrais de DOPAC e 5-HIAA não devem ser utilizados como indicadores da libertação e/ou utilização da dopamina e 5-hidroxitriptamina, mas reflectem, pelo contrário, o metabolismo intraneuronial pré-sináptico das respectivas aminas.

2) Na doença de Huntington:

- há hiperactividade dopaminérgica cerebral, para cuja avaliação os níveis de dopamina e DOPAC no LCR se afiguram como os indicadores mais adequados.

- a normalidade dos níveis de HVA pode relacionar-se mais com alterações da actividade da COMT e/ou perda celular pós-sináptica em relação ao neurónio dopaminérgico.

- a génese da coreia relaciona-se muito provavelmente com o aumento da actividade dopaminérgica cerebral.

Em resumo, o conjunto dos resultados do nosso estudo permitem concluir que a doença de Huntington se acompanha de aumento da actividade dopaminérgica cerebral e que para a identificação deste aumento a quantificação da dopamina e do DOPAC se revelaram indicadores fiáveis.

V- Resumo

Summary

Résumé

Resumo.

A doença de Huntington é uma doença progressiva do SNC de transmissão autossómica dominante caracterizada por alterações motoras e mentais com início na idade adulta. Embora a sua etiopatogenia seja desconhecida tem sido sugerido que a hiperactividade da via dopaminérgica nigro-estriada possa ser responsável por alguns dos aspectos da doença. Contudo o doseamento da dopamina no tecido cerebral e do ácido homovanílico (HVA) tanto no tecido cerebral como no LCR de doentes afectados de doença de Huntington tem fornecido resultados controversos, que levaram autores a indicar que o que existe é, pelo contrário, uma redução da actividade deste sistema. Como nesta doença o sistema dopaminérgico cerebral está preservado e o HVA se revelou um indicador pouco seguro da transmissão dopaminérgica nesta afecção, o principal objectivo deste estudo foi o de procurar esclarecer o estado da transmissão dopaminérgica cerebral na doença de Huntington através:

(1) do estudo do metabolismo da dopamina, no animal, com uma orientação específica de verificar se o ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) poderia ser um metabolito de formação essencialmente intraneuronial indicador de síntese da dopamina, dado existirem indícios de que este metabolito não é um indicador da libertação da amina; pelas mesmas razões invocados para o DOPAC procedeu-se também a um estudo de formação e metabolismo da 5-hidroxitriptamina, pois os terminais nervosos que utilizam esta amina como transmissor podem influenciar a transmissão do sistema dopaminérgico meso-estriado.

(2) da determinação das concentrações de dopamina e seus metabolitos no LCR de doentes afectados de doença de Huntington; paralelamente determinaram-se também as concentrações de noradrenalina e 5-hidroxitriptamina e dos seus metabolitos, respectivamente, o 3-metoxi-4-hidroxifeniletilglicol (MPHG) e o 5-HIAA, pois os terminais noradrenérgicos e 5-hidroxitriptaminérgicos podem influenciar a actividade do sistema dopaminérgico meso-estriado.

A formação do DOPAC foi estudada no rato macho Wistar em 3 séries de experiências.

-Na 1ª série de experiências estudou-se o efluxo da dopamina e do DOPAC em fatias de cérebro de Rato contendo estriado e *nucleus accumbens*, durante a perda espontânea, a estimulação eléctrica, a despolarização pelo potássio e a activação da libertação através de um transportador transmembranoso; todas as experiências foram realizadas em condições de inibição da COMT. A dopamina e o DOPAC foram quantificados nos tecidos e nos fluídos de superfusão por cromatografia líquida de alta pressão com detecção eletroquímica (HPLC-ECD). Durante a perda espontânea verificou-se que o efluxo esponâneo de DOPAC era muito superior ao da dopamina. A inibição da captação neuronial, pela cocaína (10 μmol/l) ou pelo GBR12909 (100 nmol/l), aumentou a perda de dopamina sem afectar a do DOPAC. A estimulação eléctrica de fatias de estriado aumentou o efluxo de dopamina, mas não o do DOPAC. A inibição da captação neuronial durante a estimulação eléctrica aumentou o efluxo de dopamina e reduziu ligeiramente os níveis de DOPAC no efluente. O bloqueio dos receptores pré-juncionais da dopamina aumentaram o efluxo de dopamina durante a estimulação eléctrica e a despolarização pelo potássio sem que o efluxo de DOPAC fosse aumentado; por sua vez, a activação dos referidos receptores diminuiu o efluxo de dopamina, mas o efluxo de DOPAC não sofreu alteração significativa. O aumento do efluxo de dopamina através de um gradiente favorável de sódio não afectou o efluxo de DOPAC.

> *Os resultados desta série experimental indicaram que a formação do DOPAC depende de dopamina que nunca foi libertada, pelo que sugere que a fonte para a formação do DOPAC possa ser dopamina axoplasmática de formação recente.*

-Na 2ª série de experiências estudou-se o ritmo de perda de dopamina, DOPAC e HVA em cérebro de ratos tratados com alfa-metil-p-tirosina. Os níveis de dopamina, DOPAC e HVA foram quantificados no estriado, *nucleus accumbens* e córtex pré-frontal por HPLC-ECD. Os ratos foram sacrificados 1, 2 e 3 horas após a inibição da síntese da amina (injecção i.p. de 200 mg/kg de alfa-metil-p-tirosina). Os níveis de dopamina, DOPAC e HVA foram transformados logaritmicamente e correlacionados com o tempo de inibição de síntese e calculadas as respectivas taxas constante de perda. Verificou-se que a queda do DOPAC era superior à da dopamina em todas as áreas

cerebrais estudadas. Verificou-se também que a taxa constante de perda da dopamina era superior nas áreas cerebrais em que a relação DOPAC/dopamina era maior (córtex frontal > nucleus accumbens > estriado). Verificou-se ainda que a taxa constante de perda do HVA era inferior à do DOPAC.

Esta série experimental permitiu confirmar a sugestão que os resultados da 1ª série haviam indicado, ou seja, que a formação do DOPAC depende essencialmente de dopamina recém-sintetizada.

-Na 3ª série estudou-se a influência da inibição selectiva da MAO-A e da MAO-B e da inibição não selectiva destas isozimas na desaminação da dopamina no estriado, *nucleus accumbens* e córtex frontal de Rato. Os níveis de dopamina, DOPAC e HVA foram quantificados por HPLC-ECD. Em três grupos de experiências administrou-se por via intraperitoneal pargilina (75mg/kg), clorgilina (2mg/kg) ou selegilina (5mg/kg) 60 min antes do sacrifício. Num outro grupo de experiências administrou-se clorgilina 15 e 30 min antes do sacrifício. Apenas a pargilina e a clorgilina provocaram uma redução significativa na formação do DOPAC e do HVA em todas as áreas cerebrais estudadas (83-97%). A inibição da MAO-A acompanhou-se de aumento dos níveis de dopamina, mais marcada no córtex frontal (52%), seguida do *accumbens* (39%) e estriado (25%). A inibição da MAO-B pela selegilina não afectou nenhum dos parâmetros estudados.

Os resultados desta série de experiências harmonizam-se bem com os resultados das séries experimentais anteriores ao mostrarem que a formação do DOPAC no cérebro de Rato ocorre essencialmente dentro dos neurónios.

-Numa quarta série de experiências estudou-se a formação do 5-HIAA, pois à semelhança do que ocorre com o DOPAC, existem também dúvidas a respeito da sua origem. Nesta série de experiências estudaram-se os efeitos da inibição da síntese e da desaminação da 5-hidroxitriptamina, no cérebro de Rato, induzidas, respectivamente, pelo 6-fluortriptofano (6-FT) e pela clorgilina. A 5-hidroxitriptamina e o 5-HIAA foram quantificados por HPLC-ECD em cinco áreas do cérebro de Rato (córtex pré-frontal e parietal, estriado, *accumbens* e tronco cerebral). Os ratos foram sacrificados 30, 60 e 90 min após administração de 6-FT (100 mg/kg i.p.) e 15, 30, 60 após clorgilina (2 mg/kg i.p.) e calcularam-se as respectivas taxas constante de queda ou acumulação. O 6-FT provocou

perda de 5-hidroxitriptamina sendo esta maior no tronco cerebral ($K=1,499\pm0,042$) e menor no accumbens ($K=0,455\pm0,043$). A queda do 5-HIAA foi sempre mais rápida que a da 5-hidroxitriptamina com a excepção do tronco cerebral. A clorgilina provocou acumulação de 5-hidroxitriptamina e perda de 5-HIAA. A taxa de acumulação da amina foi sempre inferior a taxa de perda do 5-HIAA. A taxa constante de queda do 5-HIAA após inibição da MAO-A pela clorgilina no tronco cerebral, estriado e *accumbens* foi semelhantes à obtida por inibição da síntese pelo 6-FT.

Estes resultados indicaram que a formação de 5-HIAA depende essencialmente de 5- hidroxitriptamina recém-sintetizada.

Conclusão: Os resultados destas quatro séries de experiências permitiram determinar que a formação do DOPAC e do 5-HIAA depende essencialmente do metabolismo intraneuronial das respectivas aminas e que se relaciona com a síntese das mesmas, pelo que aqueles metabolitos poderão ser utilizados como indicadores de síntese e não, como classicamente se aconselhava, de libertação da dopamina ou da 5-hidroxitriptamina, respectivamente.

Na segunda parte deste trabalho estudaram-se 11 doentes com o diagnóstico clínico de doença de Huntington, tendo sido 4 destes doentes clínica e bioquimicamente avaliados em sucessivas ocasiões ao longo de 7 anos. Os doentes, durante este período, foram avaliados clinicamente através do Mini Mental State Examination (MMSE) e do Exame Neurológico Quantitativo. Deste exame foram destacados 4 aspectos motores: coreia, bradicinésia, perturbação dos movimentos conjugados oculares e escala de incapacidade motora (EIM). Determinaram-se por HPLC- ECD os níveis da dopamina e seus principais metabolitos, o DOPAC e o HVA, no LCR de indivíduos com doença de Huntington. Por outro lado, como é conhecida a influência que a 5-hidroxitriptamina e a noradrenalina podem ter sobre os terminais dopaminérgicos no estriado, realizaram-se também estudos no sentido de verificar qual o estado da transmissão 5-hidroxitriptaminérgica e noradrenérgica nesta afecção do SNC, pelo que se quantificou também a noradrenalina, o seu metabolito desaminado e metilado, o MHPG e o 5-HIAA, o metabolito desaminado da 5-hidroxitriptamina. O grupo testemunha era constituído por 12 indivíduos submetidos a punção lombar para

realização de mielografia por suspeita de hérnia discal lombar (9 indivíduos) e fístula nasal de líquor (3 indivíduos); nenhum destes indivíduos apresentava doença sistémica ou qualquer outra doença neurológica conhecida.

Estudo clínico

A avaliação clínica mostrou uma variabilidade fenotípica da doença em elementos da mesma família. Verificou-se ainda que:

- a incapacidade funcional da doença se correlacionava com o tempo de evolução,

- as perturbações que se correlacionaram com o grau de deterioração funcional foram a EIM e o grau de perturbação dos movimentos conjugados oculares,

- a intensidade da bradicinésia era maior nos doentes com idades de início da coreia mais precoce.

- a pontuação do MMSE se correlacionava com a pontuação da EIM e da intensidade de perturbação dos movimentos conjugados oculares.

> *Estes resultados permitiram confirmar sugestões de outros autores de que a doença de Huntington é uma doença provocada por um defeito genético comum com expressão fenotípica diferente e que a sua expressão clínica, nomeadamente no que diz respeito à deterioração cognitiva, se deve essencialmente à perda celular do estriado.*

Doseamento de aminas e seus metabolitos no LCR

-As concentrações da dopamina ($497,2 \pm 154,4$ fmol/ml) no LCR dos doentes eram 10 vezes superiores às observadas no LCR dos dois únicos indivíduos do grupo testemunha em que foi possível quantificar a amina (em todos os outros os níveis de dopamina, a existirem, estavam abaixo do limite de detecção do método utilizado).

-Igualmente, as concentrações do DOPAC no LCR dos indivíduos com doença de Huntington ($67,8 \pm 9,3$ pmol/ml) encontravam-se marcadamente (14 vezes) aumentadas, quando comparadas com as concentrações deste metabolito da dopamina no LCR dos indivíduos do

grupo testemunha (4,8±1,3 pmol/ml).

-Os níveis do HVA no LCR dos doentes com doença de Huntington (223,7±36,6 pmol/ml) não eram significativamente diferentes dos observados no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (160,7±16,7 pmol/ml).

-As concentrações da noradrenalina no LCR dos indivíduos afectados de doença de Huntington (991,2±201,6 fmol/ml) não eram superiores às observadas no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (591,8±70,6 fmol/ml); da mesma forma, os níveis do MHPG no LCR dos doentes com doença de Huntington (31,3±4,6 pmol/ml) não diferiam significativamente dos observados no LCR dos indivíduos do grupo testemunha (18,8±1,6 pmol/ml).

-As concentrações do 5-HIAA não eram significativamente diferentes no LCR dos dois grupos estudados (doença de Huntington, 159,2±29,3 pmol/ml; grupo testemunha, 117,9±9.6 pmol/ml).

Os resultados obtidos indicam ainda que:

1-O sistema dopaminérgico estava hiperfuncionante neste grupo de doentes afectados de doença de Huntington .

2- Os sistemas noradrenérgicos e 5-hidroxitriptaminérgicos não estão alterados nesta afecção.

Estudo clínico versus doseamento de monaminas e seus metabolitos no LCR

Não se observou correlação entre os diversos pârametros clínicos avaliados e as concentrações de dopamina, DOPAC e HVA. Excepção a esta constatação foi constituída pela correlação das concentrações de HVA com a idade de início da coreia e com a intensidade da bradicinésia.

Nos doentes em que a coreia constituia o sintoma mais notório os níveis do HVA (263,2±41,5 pmol/ml), a soma dos níveis de HVA e DOPAC (336,6±37,3 pmol/ml) e a relação HVA/DOPAC (4,9±1,6) eram significativamente superiores ($P<0,03$, $<0,01$ e $<0,05$, respectivamente) aos observados no LCR do grupo testemunha (160,0±16,7 pmol/ml, 165,6±17,0 pmol/ml e 58,1±15,0 respectivamente) e dos doentes proponderantemente bradicinéticos (98,0±18,4 pmol/ml, 168,5±23,1 pmol/ml e 1,9±0,9 , respectivamente).

Estes resultados indicam que:

- a hiperactivivade dopaminérgica poderá estar implicada na géneseda coreia .

- existe redução da actividade dos mecanismos metilantes que interferem na formação do HVA , que será tanto mais intensa quanto menor fôr a idade de início e maior fôr a atrofia do estriado.

Em conclusão, os resultados deste estudo no seu conjunto indicam que:

-o DOPAC é um metabolito da dopamina cerebral que se forma intraneuronialmente de dopamina recém-formada e por isso é um indicador adequado da síntese da dopamina e da transmissão dopaminérgica cerebral na doença de Huntington; a mesma conclusão pode ser tirada em relação ao 5-HIAA.

-na doença de Huntington a transmissão dopaminérgica cerebral está aumentada e poderá estar relacionada com a génese da coreia. Provavelmente há redução da metilação do DOPAC em HVA.

Summary

Huntington's disease is an autossomal dominant and progressive disease of the CNS characterized by motor and mental disturbances begining in adult life. Although the patogenesis of the disease is unknown, it has been suggested that overactivity of the well-documented dopaminergic nigrostriatal pathway may be involved. However, the results of the quantification of dopamine in brain tissues of choreic patients and of homovanillic acid (HVA) in both brain tissues and the CSF are subjects of controversy; some authors even claim that the activity of dopaminergic central systems may be reduced. As in this disease the central dopaminergic systems are preserved and HVA levels have been shown not to be a reliable index of the activity of brain dopaminergic systems, the aim of the present study was to clarify the state of dopaminergic cerebral transmission in Huntington's disease.

For this purpose, it has been studied:

(1) the metabolism of dopamine in rat brain tissues in order to see whether 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) could be formed essentially intra neuronally and to some extent reflect dopamine synthesis, since previous reports have suggested that the origin of DOPAC was found not to be related with the neuronal release of the amine. Similarly and because of the well-known influence that the 5-hydroxytryptaminergic system has in the striatum, a study concerning the metabolism of 5-hydroxytryptamine was also performed .

(2) the levels dopamine and of its metabolites in the CSF of patients affected with Huntington's disease. At the same time and because 5-hydroxytryptaminergic and noradrenergic central systems are known to affect the activity of the dopaminergic central system, noradrenaline and 5-hydroxytryptamine and their metabolites, respectively, 3-methoxy-4-hydroxy-phenylethylglycol (MPHG) and 5-hydroxyindolacetic acid (5-HIAA), were also quantified.

The study concerning DOPAC formation was conducted in male Wistar rats and performed in three different sets of experiments:

- In the first set, the overflow of dopamine and DOPAC from slices of striatum and slices containing the nucleus accumbens of the rat, during the spontaneous loss and as elicited by electrical stimulation, depolarization by potassium and carrier-mediated release, in conditions of inhibition of COMT, was studied. Levels of dopamine and DOPAC in tissues and in the superfusates were quantified by means of high pressure liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). During spontaneous loss, DOPAC levels were higher than levels of dopamine in the superfusates. Inhibition of neuronal uptake by cocaine (10 μmol/l) and GBR 12909 (100 nmol/l) was found to increase the spontaneous outflow of dopamine, but not that of DOPAC. Electrical stimulation of slices of striatum produced an increase in the levels of dopamine, but not of DOPAC, in the overflow. Inhibition of neuronal uptake during electrical stimulation potentiated the release of dopamine and slightly reduced the levels of DOPAC in the effluent. Changes in the electrical-stimulated or potassium-evoked release of dopamine, as a result of blokade or activation of prejunctional dopamine receptors, was found not to change the levels of DOPAC in the effluent. Release of dopamine, as induced by a favourable gradient of sodium, was not accompained by an increased release of DOPAC.

> *The results presented demonstrate that most of the DOPAC does not have its origin in a recently-released pool of dopamine.*

-In the second set of this study the rates of disappearence of dopamine, DOPAC and HVA in the brain of rats treated with the tyrosine hydroxylase inhibitor alfa-methyl-p-tyrosine were mesured. Levels of dopamine, DOPAC and HVA in brain tissues were measured by means of HPLC-ECD. Rats were sacrified 1, 2 and 3 hours after the administration of alfa-methyl-p-tyrosine (200 mg/kg i.p.). Levels of dopamine, DOPAC and HVA in tissue were logarithmically transformed, plotted against the duration of inhibition of tyrosine hydroxylase and the constant rates of decline of dopamine and of amine metabolites calculated. The rate constant of decline of DOPAC in each area of the brain was found to be greater than that for dopamine. The rate constant of decline of dopamine was found to be greater in areas of the brain presenting the highest DOPAC/dopamine tissue ratios (prefrontal cortex > nucleus accumbens > striatum). The rate

of loss of HVA after inhibition of dopamine synthesis was lower than that for DOPAC.

The present results show that a substantial amount of DOPAC in brain derives from a newly-formed pool of dopamine.

- in the third set of experiments, the role of monoaminoxidase (MAO), type A and B, in the deamination of dopamine in striatum, nucleus accumbens and frontal cortex of the rat were studied. Levels of dopamine, DOPAC and HVA in brain tissues were quantified by means of HPLC-ECD. Rats were given pargyline (75 mg/kg, i.p.), selegyline (5 mg/kg, i.p.) and clorgyline (2 mg/kg, i.p.), 60 min before sacrifice; in some experiments, clorgyline (2 mg/kg, i.p.) was also given 15 and 30 min before sacrifice. Only pargyline and clorgyline were found to significantly reduce the formation of DOPAC and HVA in all the three brain areas under study (83-97% reduction). Inhibition of dopamine deamination by clorgyline and pargyline was accompained by an increase in dopamine tissue levels. The increase of dopamine tissue levels, as a result of the inhibition of MAO-A, was more marked in the frontal cortex (52% increase) and in the accumbens (39% increase), than in the striatum (25% increase). Inhibition of MAO-B by selegyline did not affect any of the parametters under study.

These results fit well with those reported in the two firsts sets of experiments, suggesting that a substantial amount of DOPAC in brain derives from deamination of dopamine intraneuronally by MAO-A.

The study concerning de formation of 5-HIAA was conducted in a fourth set of experiments; the effects of inhibition of the enzyme tryptophan hydroxilase by 6-flourotryptophan (6-FT) (in the first set) and type A monoaminoxidase (MAO-A) by clorgyline (in the second set) in different areas of the rat brain were studied. The rates of 5-hydroxytryptamine and 5-HIAA disapearance and 5-hydroxytryptamine accumulation were calculated. 5-hydroxytryptamine and 5-HIAA tissue levels were quantified in the rat nucleus accumbens, striatum, brain stem, frontal and parietal cortex by means of HPLC-ECD. Rats were sacrified 30, 60, or 90 min and 15, 30 or 60 min after the administration of 6-FT (100 mg/kg, i.p.) and clorgyline (2mg/kg, i.p.), respectively. 5-hydroxytryptamine and 5-HIAA tissue levels were logarithmically transformed, plotted against the duration of inhibition of tryptophane hydroxylase or MAO-A and the rate constant (k) of amine or amine metabolite decline and amine accumulation

calculated.
The rate constant of 5-hydroxytryptamine decline after tryptophan hydroxilase inhibition differed between the brain areas studied, the highest and lowest values occurring in the brain stem ($k=1,499\pm0,042$) and the nucleus accumbens ($k=0,455\pm0,043$) respectively. In all brain areas studied, with the exception of the brain stem, the rate constant of 5-hydroxytryptamine was lower than that of for the corresponding 5-HIAA. The rate constant of 5-HIAA decline after MAO-A inhibition in the brain stem, striatum and nucleus accumbens ($k=1,289$ to $0,965$) were similar to those found after tryptophan hydroxilase inhibition. In the frontal and parietal cortex, the rate constant of 5-HIAA decline after clorgyline ($k=0,509$ and $k=0,936$, respectively) were lower than those observed after tryptophan hydroxilase inhibition.

The present results suggest that recently-synthetized 5-hydroxytryptamine in brain is deaminated to a large extent. Therefore, it is not advisable to use brain 5-HIAA as an index of 5-hydroxytryptamine release.

<u>In conclusion</u>, the results of these 4 sets of experiments show that the formation of DOPAC and 5-HIAA depend essentially on the intraneuronal metabolism of the respective amines suggesting that they may be used as indexes of amine synthesis and not of amine release, as classically mentioned.

In the second part of this study, eleven patients (from eitgh families) with the criteria for definitive Huntington's disease were studied. Four of these patients were clinically and biochemically evaluated for a seven year period. Patients were evaluated clinically with the Mini Mental State Examination (MMSE) and the Quantitative Neurological Examination. From this last test four motor parameters were evaluated alone: chorea, bradykinesia, ocular gaze impairments and motor impairment scale (MIS). Levels of dopamine, DOPAC and HVA, in the CSF of patients affected with Huntington's disease were measured by means of high performance liquid chromatography with electrochemical detection. At the same time and because of the well-known influence that noradrenergic and 5-hydroxytrpyptaminergic cerebral systems have on dopaminergic cerebral system, a study concerning the state of these cerebral systems in these

patients, was also performed. Levels of noradrenaline and 5-hydroxytryptamine and their metabolites, respectivelly, MPHG and 5-HIAA, in the CSF of choreic patients were also measured. The control group consisted of twelve subjects submited to myelography with a suspected lumbar herniation (9 subjets) and nasal fistula (3 subjects) without known systemic or other neurological disease.

Clinical study

The clinical evaluation as shown that:

- there is a fenotypical variability, even in patients of the same familly,

- the functional disability of the disease correlates with the evolution time,

- the score of the MIS and of the ocular gaze impairment correlates with the functional disability,

- the bradykinesia was severest in patients with a younger age at onset of symptoms,

- the score of the MMSE correlates with the score of the MIS and of the ocular gaze impairment.

These results fit well with the results of others author claiming that Huntington's disease is inherited from a single genetic mutation with a considerable phenotyppical variation and its clinical expression essentially depends in the cellular loss in the striatum.

Quantification of monoamines and metabolites in the CSF

- The average levels of dopamine (497.2 ± 154.4 fmol/ml) in the CSF of choreic patients was 10 fold that found in the CSF of the two control subjects (45.1 and 46.6 fmol/ml).

- Levels of DOPAC (67.8 ± 9.3 pmol/ml) in the CSF of choreic patients were markedly (14 fold) increased in comparision with those of the control subjects (4.8 ± 1.3 pmol/ml).

- HVA levels in the CSF of patients affected with Huntington's disease (223.7 ± 36.6 pmol/ml) were not significantly different from those in the

CSF of control subjects (160.7 ± 16.7 pmol/ml).

- No statistical difference was found in noradrenaline levels in the CSF between patients affected with Huntington's disease (991.2 ± 201.6 fmol/ml) and control subjects (591.8 ± 70.6 fmol/ml). Similarly, MPHG levels in the CSF of choreic patients (31.3 ± 4.6 pmol/ml) were not significantly different from those in control subjects (18.8 ± 1.6 pmol/ml).

- 5-HIAA levels in the CSF of Huntington's disease patients (159.2 ± 29.3 pmol/ml) were not significantly different from those of the control subjects (117.9 ± 9.6 pmol/ml).

These results suggest that:

1- there is hiperactivity of the dopaminergic cerebral systems in this group of patients affected with Huntington's disease,

2- the noradrenergic and the 5-hydroxytryptaminergic systems appear not to be affected in this disease.

Clinical study versus monoamines and metabolites quantification in the CSF

The levels of the dopamine, DOPAC and HVA did not correlate with the clinical parametters evaluated. One exception, was the correlation observed between HVA levels in CSF of Huntington's disease patients and the bradykinesia score and age at the onset of symptoms. In the patients with chorea, as the most notorious symptom, HVA levels (263.2 41.5 pmol/ml), the algebraic sum of HVA and DOPAC (336.6 ± 37.3 pmol/ml) and the ratio HVA/DOPAC (4.9 ± 1.6) were significantly higher ($P < 0,03$, $< 0,01$ e $< 0,05$, respectivelly) than those in the CSF of control subjects (1600 ± 16.7, 165.6 ± 17.0 pmol/ml and 58.1 ± 15.0 respectively) and those in the CSF of patients with bradykinesia (98.0 ± 18.4, 168.5 ± 23.1 and 1.9 ± 0.9 pmol/ml, respectively).

These results suggest that:

- the hyperactivity of dopaminergic system could be implicated in the genesis of chorea

- the activity of the methylating systems that interne in the

formation of HVA could be reduced in Huntington's disease; this is more evident as lower is the age at onset and therefore the higher the celullar loss in the striatum.

Conclusion.

This study show that:

- in brain, DOPAC is formed intraneuronally from newly-synthetized dopamine and therefore, might be a reliable index of dopamine synthesis and of dopaminergic cerebral transmission in Huntington's disease.

- in Huntington's disease there is an increased dopaminergic cerebral transmission that could be implicated in the genesis of chorea. Probably, there is also a decreased activity in the methylation of DOPAC to HVA.

Résumé

La maladie d'Huntington est une maladie progressive du SNC de transmission autossomique dominante caractérisée par des altérations motrices et mentales commençant à l'âge adulte. Quoique son etiopathogénie soit inconnue, il a été suggéré que l'hyperactivité de la voie dopaminergique nigro-striée pourrait expliquer quelques aspects de la maladie. Toutefois, les résultats du dosage de la dopamine dans le tissu cérébral et de l'acide homovanilique (HVA) tant dans le tissu cérébral que dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients présentant la maladie d'Huntington sont au moins controversés; cette situation a amené quelques auteurs à indiquer que, tout autrement, la maladie d'Huntington se présente avec diminuition de l'activité de la voie dopaminergique ci-dessus mentionnée.

Vu que le système dopaminergique est préservé dans cette maladie et les concentrations de l'HVA se sont révelés comme des indicateur peu sûres de la transmission dopaminergique dans cette entité nosologique, l'objectif principal de cette étude a été l'éclaircissement de l'état fonctionel de la transmission dopaminergique cérébrale dans la maladie d'Huntington, aux moyens:

(1) de l'étude du métabolisme de la dopamine, chez l'animal, avec l'orientation spécifique de vérifier si l'acide 3,4-dihydroxyphénylacétique (DOPAC) pourrait représenter un métabolite de formation essentiellement intraneuronal indicateur de la biosynthèse de la dopamine, une fois que la validité de ce métabolite comme indicateur de la libération de l'amine est déjà discutable; dans le même sens et par la même raison, on a réalisé aussi une étude du métabolisme de la 5-hydroxytryptamine, vu l'influence que les afférents tryptaminergiques ont sur les structures du corps striés.

(2) du dosage des concentrations de dopamine et de ses métabolites dans le LCR de patients présentant la maladie d'Huntington; en outre, le dosage de la noradrénaline, de la 5-hydroxytryptamine, du 3-méthoxy-4-hydroxyphénylglycol (MPHG) et de l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA), vu que la noradrénaline et la 5-hydroxytryptamine peuvent influencer l'activité du systéme dopaminergique cérébral.

La formation du DOPAC a été étudiée, dans trois séries d'experiences, chez le Rat mâle Wistar.

Dans la prémière série expérimentale a été étudié l'efflux de la dopamine et du DOPAC au moyen de la superfusion de tranches de cerveau contenant le corps striés et le *nucleus accumbens*; les dosages ont été faits pendant la perte spontanée, la stimulation électrique, la dépolarisation par le potassium et l'activation de la libération au moyen d'un transporteur transmembraneux; dans toutes les expériences la COMT a été inhibée.

La dopamine et le DOPAC ont été dosés dans les tissus et dans les liquides de superfusion par chromatographie liquide de haute pression avec détection électrochimique (HPLC-ECD). Pendant la perte spontanée l'efflux du DOPAC était trés superieur à celui de la dopamine. L'inhibition de la captation neuronal, par la cocaïne (10 μmol/l) ou par le GBR 12909 (100 μmol/l) a provoqué une augmentation de la perte de la dopamine sans modifier celle du DOPAC. La stimulation électrique des tranches de corps striés augmentait l'efflux de DOPAC. L'inhibition de la captation neuronale pendant la stimulation électrique augmentait encore plus l'efflux de dopamine et diminuait trés légèrement l'efflux de DOPAC. Le blocage des récepteurs présynaptiques de la dopamine augmentait aussi l'efflux de la dopamine pendant la stimulation électrique et la dépolarisation par le potassium, sans aucune augmentatation de l'efflux de DOPAC; à son tour, l'activation de ces recepteurs diminuait l'efflux de DOPAC. L'augmentation de l'efflux de dopamine provoquée par un gradient favorable de sodium n'affecte pas l'efflux de DOPAC.

> *Les résultats de cette série expérimentale indiquent que la formation de DOPAC provient de ladopamine non libérée auparavant, ce qui suggére que la source pour la formation du DOPAC est probablement la dopamine axoplasmatique de formation récente.*

Dans la 2ème série d'expériences, réalisée chez le Rat traité par l'alpha-méthyl-p-tyrosine, nous avons étudié la vitesse de la perte de la dopamine, du DOPAC et de l'HVA par le cerveau. Les dosages ont été faits dans le corps striés, le *nucleus accumbens* et le cortex préfrontal, au moyen de l'HPLC-ECD.

Le sacrifice des rats eut lieu 1, 2 et 3 heures aprés l'inhibition de la synthèse de la dopamine (injéction i.p. de 200 mg/kg de alpha-methyl-p-tyrosine). On a étudié la correlation entre les concentration de la dopamine , du DOPAC e de l'HVA aprés la transformation logarithimique, avec le temps d'inhibition de la synthèse de l'amine; les taux constants de perte de

chaqu'une des trois substances ont été aussi calculés.

On a constaté que la perte du DOPAC etait supérieure à celle de la dopamine dans toutes les régions cérébrales etudiées. On a pu vérifier aussi que le taux constant de perte de la dopamine était supérieur dans les régions cérébrales présentant une relation plus élevée DOPAC/dopamine (cortex préfrontal > *nucleus accumbens* > corps striés). On a pu encore constater que le taux constant de perte de l'HVA était inferieur aux taux constant de perte du DOPAC.

Cette série experimentale nous à permis de confirmer la suggéstion tirée des résultats de la 1ère série d'expériences, c'est à dire, que la formation du DOPAC dépend essentiellement de dopamine récemment synthétisée.

Dans la 3ème série d'experiences on a étudié l'influence de l'inhibition sélective de la MAO-A, de la MAO-B et de l'inhibition non seléctive de ces enzymes sur la désamination de la dopamine dans le corps striés, le *nucleus accumbens* et le cortex préfrontal du Rat. La dopamine, le DOPAC et l'HVA ont été dosés par HPLC-ECD. On a administré, par voie i.p., à trois groupes de rats, de la pargyline (75 mg/kg), de la clorgyline (2 mg/kg) ou de la selegiline (5 mg/kg), 60 min avant de sacrifier les animaux. À un autre groupe de rats on a administré de la clorgyline 15 et 30 min avant de sacrifier les animaux. Seulement la pargyline et la clorgyline ont provoqué une réduction significative de la formation du DOPAC e de l'HVA dans toutes les régions cérébrales étidiées (83-97%). L'inhibition de la MAO-A s'est accompagnée d'une augmentation des niveaux de dopamine; cette augmentation a été plus marquée dans le cortex préfrontal (52%) que dans l'*accumbens* (39%) et le corps striés (25%). Aucune modification des paramétres etudiés a été observée aprés l'inhibition de la MAO-B par la selegiline.

Les résultats de cette 3éme série expérimentale cóincident avec les résultats présentés auparaant, car ils démontrent que la formation de DOPAC dans le cerveau de Rat se fait essentiellement à l'interieur du neuronium.

Dans une 4éme série expérimentale nous avons étudié la formation du 5-HIAA, une fois que, tout comme le DOPAC, l'origine du métabolite desaminé de la 5-hydroxytryptamine est aussi douteuse. Dans ces expériences on a étudié l'influence de l'inhibition de la synthèse, d'une part, et de la désamination, d'autre part, de la 5-hydroxytryptamine dans le

cerveau du Rat, induite respectivement par le 6-fluortryptophane (6-FT) et par la clorgyline. La 5-hydroxytryptamine et le 5-HIAA ont été dosés par HPLC-ECD dans 5 régions cérébrales (córtex préfrontal et parietal, corps striés, *nucleus accumbens* et tronc cérébral). Les rats ont été sacrifiés 30, 60 et 90 min aprés l'administration de 6-FT (100 mg/kg, i.p.) et 15, 30 e 60 min aprés l'administration de clorgyline (2 mg/kg i.p.); par le dosage de la 5-hydroxytryptamine et du 5-HIAA, on a calculé: dans le cas de l'inhibition da la synthèse de l'amine, les taux de perte da l'amine et du 5-HIAA et dans le cas de l'inhibition de la désamination le taux d'accumulation de l'amine et le taux de perte du 5-HIAA. L'administration du 6-FT a provoqué une perte de 5-hydroxytryptamine, celle ci a été plus grande dans le tronc cérébral ($K=1,499\pm0,042$) et plus petite dans l'*accumbens* ($K=0,455\pm0,043$). La perte du 5-HIAA a toujours été plus rapide que celle de la 5-hydroxytryptamine à l'exception du tronc cérébral. La clorgyline a provoqué une acummulation de 5-hydroxytryptamine et une perte de 5-HIAA. Le taux d'accumulation de l'amine a toujours été inférieur au taux de perte de le 5-HIAA. Les taux constants de perte du 5-HIAA aprés l'inhibition de la MAO-A par la clorgyline dans le tronc cérébral, le corps striés et l'accumbens étaient semblables à ceux obtenus par l'inhibition de la synthèse de l'amine par le 6-FT.

> *Ces résultats indiquent que la formation de 5-HIAA dépend essentiellement de la 5-hydroxytryptamine récemment synthétisée.*

Conclusion: **Les resultats de ces quatre séries expérimentales nous ont permis de reconnaître que la formation du DOPAC et du 5-HIAA dépend essentiellement du métabolisme intraneuronal des amines respectives et qu'elle est en rélation directe avec la synthèse de ces amines; ainsi, le DOPAC et le 5-HIAA pourront être utilisés comme des indicateurs de la synthèse, respectivement, de la dopamine et de la 5-hydroxytryptamine et non, comme il est classique d'admettre, comme des indicateurs de la libération de ces amines.**

Dans la deuxiéme partie de cette dissertation, nous avons étudié 11 malades avec le diagnostic clinique de maladie d'Huntington; quatre malades ont été evalués, du point de vue clinique et biochimique, en sucessives occasions, tout au long de sept ans. Les malades pendant cette période ont été évalués cliniquement au moyens de la "Mini Mental State Examination" (MMSE) et de l'Examen Neurologique Quantitatif. Dans ce dernier examen quatre aspects ont été soulignés: la chorée, la bradicinésie,

l'alteration des mouvements conjugués occulaires et l'echelle d'incapacité motrice (EIM). On a dosé par HPLC-ECD les taux de dopamine et de ses principaux métabolites, le DOPAC et l'HVA, dans le LCR de patient souffrant de la maladie d'Huntington. D'un autre coté, considerantque la 5-hydroxytryptamine et la noradrénaline peuvent influencier l'activité des neurones dopaminergiques dans le corps striés, on a étudié aussi l'état de la transmission 5-hydroxytryptaminergic et noradrenérgique dans cette maladie du SNC, en dosant la noradrénaline et son métabolite désaminé et methylé (le MPHG) et le métabolite désaminé de la 5-hydroxytryptamine (le 5-HIAA). On a étudié encore un groupe témoin, reprénsenté par 12 personnes soumises à une ponction lombaire pour la réalisation de myélographie par soupçon d'hérnie discale lombaire (9 personnes) et fistule nasal du LCR; aucune de ces personnes ne présentaient pas de maladie systhèmique ou autre maladie neurologique reconnue.

Étude clinique

L'évaluation clinique a montré une variabilité phénotypique de la maladie parmi les membres de la même famille. On a encore vérifié que:

-il y a une corrélation positive entre l'incapacité fonctionnelle et le temps d'évolution de la maladie;

-les altérations en rapport avec le degré de détérioration fonctionnelle étaient la EIM et le degré d'altération des mouvement conjugués oculaires;

-l'intensité de la bradicinésie etait plus élevée chez les malades présentant la chorée à une âge précoce;

-la ponctuation de la MMSE était en rapport avec la ponctuation de l'EIM et l'intensité de l'altération des mouvements conjugués oculaires.

Ces résultat nous ont permis de confirmer les suggestions d'autres chercheurs dans le sens que la maladie d'Huntington et une maladie provoquée par une anomalie genétique commune avec unevariable expression phénotypique et que son expression clinique, notamment la détérioration cognitive, se doit essentiellement à la perte cellulaire du corps striés.

Dosage des amines et de leurs métabolites dans le LCR

-Les concentration de dopamine (497,2±154,4 fmol/ml) dans le LCR chez les malades étaient 10 fois supérieures à celles observées chez les 2 seules personnes du groupe témoin à qu'il a été possible d'évaluer la concentration de l'amine (chez toutes les autres, le LCR ne contenait pas de l'amine ou sa concentration était inferieure au limite de détection de la methode utilisée).

-De même, les concentrations de DOPAC dans le LCR chez les malades d'Huntington (67,8±9,3 pmol/ml) étaient aussi très supérieures (14 fois) à celles observées chez les personnes du groupe témoin (4,8±1,3 pmol/ml).

-Les taux d'HVA dans le LCR chez les malades d'Huntington (223,7±36,6 pmol/ml) n'etaient pas significativement différents de ceux observés dans le LCR chez le groupe témoin (160,7±16,7 pmol/ml).

-Les concentration de la noradrénaline dans le LCR chez les malades d'Huntington (991,2±201,6 fmol/ml) n'etaient pas supérieures à clles observées chez le groupe témoin (591,8±70,6 fmol/ml); la même chose a été observée en ce qui concerne les taux de MPHG (31,3±4,6 pmol/ml et 18,8±1,6 pmol/ml, respectivement).

-Encore des résultat semblables furent observés avec les concentration dans le LCR du 5-HIAA (maladie d'Huntington 159,2±29,3 pmol/ml; groupe témoin 117,9±9,6 pmol/ml).

Les résultat obtenus indiquent encore que:

1- Le système dopaminergique cérébral etait hyperfonctionnant chez le groupe des patients avec la maladie d'Huntington;

2- l'activité des systèmes noradrénergique et 5-hydroxytryptaminergique ne se trouvait pas modifiée dans cette maladie.

Étude clinique versus le dosages des monoamines et leurs métabolites dans le LCR

Il n'y a pas de corrélation entre les divers paramétres cliniques évalués et les concentrations de dopamine, du DOPAC et de l'HVA. La seule

exception a été la corrélation positive des concentrations de l'HVA avec l'âge du commencement de la chorée et avec l'intensité de la bradicinésie.

Chez les malades présentant la chorée comme le symptôme le plus saillant les taux de l'HVA (263,41,5 pmol/ml), l'addition des taux de l'HVA et du DOPAC (336,6±37,3 pmol/ml) et la rélation HVA/DOPAC (4,9±1,6) étaient significativement supérieures à ceux ($P<0,03$, $P<0,01$ et $P<0,05$, respectivement) observés chez le groupe témoin (160,0±16,7 pmol/ml, 165,6±17,0 pmol/ml et 58,1±15,0) et à ceux des malades avec bradicinésie la plus intense (98,0±18,4 pmol/ml, 168,5±23,1 pmol/ml et 1,9±0,9).

Ces résultats indiquent:

-l'hyperactivité dopaminergique pourra être impliquée dans la genése de la chorée;

-il y a une réduction de l'activité des enzymes methylantes agissant dans la formation de l'HVA; ce phenomène sera d'autant plus d'intense car plus la chorée commence à bas âge plus l'atrophie du corps strié augmente.

En conclusion, dans son ensemble, cette étude indique:

-Le DOPAC est un métabolite de la dopamine qui est synthétisée à intérieur du neurone á partir de la dopamine de formation récente; il est, ainsi, un indicateur convenable de la synthèse de la dopamine et de l'état de la transmission dopaminergique cérébrale dans la maladie d'Huntington.

-Dans la maladie d'Huntington la transmission dopaminergique cérébrale est augmentée, ce que pourra être en rélation avec la genése de la chorée. Probablement il y a une réduction de la methylation du DOPAC en HVA.

VI - Apêndice

1. Resumo das histórias clínicas
2. Escala de incapacidade funcional
3. Mini Mental state Examination
4. Exame Neurológico quantitativo

1. Resumo das histórias clínicas

História Clínica Nº 1 (H1)

Identidade: MRS, 45 anos, sexo masculino, casado, empregado de escritório, natural de Vila Nova de Famalicão

História da doença: Desde há cerca de 13 anos antes da observação começou a ter dificuldades de adaptação no emprego e na vida familiar por irritabilidade fácil e agressividade. Cerca de 3 anos após a família começa a notar o doente irrequieto com movimentos involuntários dos dedos das mãos que se foram agravando tornando-se mais amplos e generalizados. Cerca de dois anos após abandona o emprego alegando incapacidade. Desde então, foi abandonando progressivamente todos os seus passatempos permanecendo cada vez mais tempo em casa, sem se dedicar a qualquer tarefa tornando-se cada vez mais dependente com dificuldades de marcha, fala cada vez mais imperceptível, disfagia acabando por acamar.

Antecedentes pessoais e familiares: Terminou o 2ª ciclo liceal com 14 anos e era empregado de escritório tendo realizado as suas tarefas profissionais sem dificuldade até há 13 anos. A família desconhece a existência de doenças graves anteriores. Uma irmã faleceu há cerca de 4 anos no Hospital de V.N. de Famalicão com doença semelhante (movimentos involuntários generalizados de instalação progessiva e demenciação descritas pelo mesmo neurologista que enviou o doente à consulta). Os restantes irmãos estão no Brasil desconhecendo-se qual o seu estado. Os pais faleceram há muitos anos não se conseguindo informações seguras dessa geração.

Observação e exames complementares: Mau estado de nutrição com idade aparente superior á real. Vigil, disartria marcada, acamado incapaz de manter postura de pé e caminhar. Movimentos coreicos generalizados de intensidade moderada. Movimento espontâneo e voluntário conservado sem lentificação. Tono muscular diminuído, força muscular dificil de avaliar, reflexos osteotendinosos vivos e simétricos e cutâneo plantares extensores. Presença de reflexos arcaicos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal, número de acantócitos < 1%. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG de baixa voltagem, lento e irregular. TC cerebral, atrofia cortico-subcortical com redução franca do diâmetro dos núcleos caudados.

História Clínica Nº 2 (H2)

Identificação: AGS,, 32 anos, sexo feminino, casada, engarrafadeira, natural da Madalena, Vila Nova de Gaia.

História da doença: Início provavelmente há cerca de 7 anos, altura em que teve de abandonar emprego por partir muitas garrafas. Nessa altura a família notou a presença de movimentos involuntários. Desde há cerca de 4 anos necessita de ajuda da mãe no trabalho

doméstico não só por agravamento dos movimentos, mas também por "perda de memória". Nas actividades do dia-a-dia, desde há cerca de alguns meses descuida a sua higiene diária, veste-se a alimenta-se sem ajuda . Mantêm uma relação carinhosa com os filhos, embora apresente uma irritabilidade exagerado com agressividade. Posteriormente a esta observação, a doente foi institucionalizada por incapacidade de tomar conta da casa e dos filhos tendo falecido de causa não conhecida.

Antecedentes pessoais e familiares: Atrazo do desenvolvimento psicomotor. Completou a terceira classe do ensino primário aos 14 anos, tendo adiquirido a capacidade de escrita, leitura e cálculo simples (somar e subtrair). Tem um irmão (H3) que frequenta a consulta com sintomatologia idêntica. Segundo a mãe, o pai abandonou o lar há muitos anos tendo-se perdido conctato desde então, contudo tinha uma irmã com sintomatologia idêntica aos seus filhos (apresentava movimentos semelhantes e alterações graves do comportamento social).

Observação e exames complementares: Doente com bom estado geral, idade aparente correspondendo à real, com aspecto descuidado no seu arranjo pessoal, bem orientada no espaço, tempo e pessoas, apresentando-se colaborante na entrevista com atenção dispersa mas captável, apresentando alterações da memória recente e remota, compreendendo razoávelmente o que lhe era perguntado mas com lentificação marcada tanto na compreensão como na resposta, com fala pouco perceptível. Insónia total, sem anorexia mas referindo perda de peso que não sabe precisar desde há cerca de um ano. Alimenta-se sem ajuda mas para a sua higiene diária e para se vestir necessita de pequeno auxilio que se limita práticamente a uma orientação verbal. Movimentos coreicos atingindo todos os segmentos corporais, contínuos e de intensidade média que interferem, mas não impedem, o movimento voluntário que se processa com uma velocidade normal. Marcha com desiquilibrio perturbada pelos movimentos coreicos. Rigidez à direita, hiperreflexia generalizada com reflexos cutâneo-plantares em flexão e ausência de reflexos arcaicos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG realizado em repouso vigil com traçado de baixa voltagem, irregular e com predomínio de actividades lentas sem focalização. TC cerebral, sem atrofia cerebral difusa, atrofia dos núcleos caudados.

História Clínica Nº 3 (H3)

Identificação: FGS, 30 anos, sexo masculino, casado, carregador, natural da Madalena, Vila Nova de Gaia.

História da doença: Cerca de dois anos antes da 1ª observação, queixas de cefaleias, perda de "memória", irritabilidade fácil com períodos de desânimo. Há cerca de 1 ano, queixas de falta de força e incapacidade de estar quieto. Posteriormente refere presença de movimentos involuntários no membro superior esquerdo que o incapacitavam na realização da sua profissão. Após a primeira observação, agravamento progressivo da coreia, dificuldades de

marcha, perda de capacidades anteriormente adiquiridas, como cálculo e leitura, perda do juizo crítico, desinibição, agressividade marcada, delírios de ciúme. Instituido nesta altura tratamento neuroléptico (haloperidol 15 mg/dia).

Antececentes pessoais e familiares: Sem antecedentes patológicos conhecidos. Bom rendimento escolar, completou o ensino primário aos 11 anos, tendo começado a trabalhar logo após como aprendiz de trolha. Antecedentes familiares- ver história nº 2.

Observação e exames subsidiários: Doente consciente, colaborante no exame com aspecto cuidado e muito ansioso. Refere sentir-se desanimado devido à incapacidade motora e intelectual que sente, mas negando a carga hereditária da doença (não relaciona a sua patologia com a da irmã). Bom estado geral, sem anorexia, sem perda de peso e não refere insónia. Movimentos coreicos permanentes e de intensidade moderada no membro superior esquerdo, movimentos esporádicos e discretos da mão direita e movimentos coreicos esporádicos e de intensidade ligeira do tronco. Fala disártrica mas facilmente perceptível. Realiza movimentos alternados e finos. Tono muscular normal, reflexos profundos vivos e simétricos, cutâneo-plantares flexores. Ausência de reflexos primitivos. Na segunda observação, após cinco anos, deterioração mental acentuada da qual o doente se queixa, com movimentos coreicos de intensidade severa e generalizada, lentificação de todo o movimento. Tono muscular normal, hiperreflexia generalizada e cutâneo-plantares flexores. Ausência de reflexos primitivos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade.

Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG (1ª observação) traçado de voltagem normal, irregular e com frequência predominante de 9 ciclos/seg, sem focalização, (2ª observação) disritmia cerebral difusa. TC cerebral, sem atrofia cerebral difusa, alargamento dos cornos frontais por atrofia dos núcleos caudados, bem evidente em 1984 com agravamento franco em 1989.

História Clínica Nº 4 (H4)

Identificação: ISG, 31 anos ,sexo femenino, casada, doméstica, natural do Porto.

História da doença: Há cerca de 10 anos começa a apresentar comportamentos inadequados, com desinibição marcada. Após o nascimento da sua primeira filha demonstrou completa indiferença afectiva em relação à filha, deleixo no cuidado da casa e no seu arranjo pessoal. Cerca de um ano após o início desta sintomatologia começa a apresentar movimentos involuntários, aparentemente generalizados. Internada em 1986 por apresentar alucinações visuais e auditivas bem formadas (via pessoas e ouvia vozes), nesta altura apresentava uma coreia generalizada de intensidade ligeira com postura parada e lentificação do movimento. A sintomatologia alucinatória foi controlada com haloperidol 10 mg/dia. Nessa altura a doente já se encontrava incapaz de cuidar da sua casa, embora com ajuda ainda realizasse algumas tarefas caseiras simples e fosse capaz de cuidar da sua higiene e alimentação sem ajuda. Em 1987 a doente é novamente internada (1ª observação), com sintomatologia alucinatória

semelhante à anterior (os neurolépticos tinham sido suspensos há cerca de seis meses). O quadro clínico era semelhante ao anterior e as alucinações foram controladas com haloperidol 6 mg/dia, que foi suspenso seis meses após. Um ano após, em 1988 (2ª observação) é novamente internada por apresentar hipertermia sem causa evidente, emagrecimento acentuado, recusa em alimentar-se, exigindo entubação naso-gástrica para alimentação. Nesta ocasião a doente apresentava atitude negativista, em repouso uma postura parada em flexão, com lentificação de toda a actividade motora voluntária que despertava coreia generalizada de intensidade severa e movimentos distónicos mais marcados no tronco. A hipertermia cedeu sem tratamento específico. Medicada com amitriptilina (75 mg/dia) com franca melhoria do seu estado geral, começou a alimentar-se "per os" e tornou-se mais colaborante, mantendo os sinais neurológicos acima referidos. O antidepressivo é suspenso passados cerca de 6 meses após. Em 1989 (3ª observação) é novamente internada a pedido da família por mau estado geral, provocado por recusa em alimentar-se.

Antececentes pessoais e familiares: Até aos 17 anos pouco se conhece dos antecendentes da doente, esteve numa instituição onde fez a 3ª classe e aprendeu a bordar. Sabia ler, escrever e fazer contas. Aos 17 anos regressou a casa de família e ainda trabalhou até casar como empregada doméstica. As tias do marido, com quem vive actualmente, referem que nunca teve um comportamento normal, embora este se tornasse nitidamente anormal já após o casamento aos 19 anos. Antecedentes familiares: A mãe faleceu aos 30 anos institucionalizada em hospital psiquiátrico com o diagnóstico de doença de Huntington existindo também a informação de que a avó materna teria morrido da mesma causa. Tem 3 irmãos, tendo sido apenas possível contactar com uma irmã, aparentemente normal, tendo informado da recusa dos outros irmãos em serem observados e de ambos receberem tratamento em hospitais psiquiátricos.

Observação e exames complementares: Doente com bom estado geral, idade aparente correspondendo à real, com aspecto descuidado no seu arranjo pessoal, bem orientada no espaço, tempo e pessoas, apresentando-se colaborante na entrevista com atenção dispersa mas captável e com uma lentificação muito acentuada tanto na compreensão como nas respostas. O discurso era dificilmente perceptível, pobre mas coerente. A memória recente aparentemente conservada, mas com dificuldade em contar a sua história pregressa. Insónia total, sem anorexia nem perda de peso. Alimenta-se sem ajuda mas para a sua higiene diária e vestir necessita de pequeno auxilio. A doente em repouso apresentava movimentos coreicos atingindo todos os segmentos corporais, contínuos e de intensidade ligeira, que se agravam nitidamente em intensidade com o movimento ou o stress interferindo em todo actividade motora voluntária, incluindo a marcha e a expressão verbal. O movimento voluntário processa-se com lentidão exagerada e dificuldade no seu início. Rigidez generalizada, hiperreflexia generalizada com reflexos cutâneo-plantares em flexão e ausência de reflexos primitivos. Na segunda observação, discurso mais pobre com maior atrazo e lentificação nas respostas, mais dependente na alimentação e totalmente dependente na higiene e no vestir. Agravamento da coreia e da bradicinésia, mesmo após recuperação do estado geral. Reflexos profundos mantinham-se exagerados com clónus e cutâneo-plantares extensores. Na terceira

observação exame neurológico sobreponível ao anterior com humor depressivo, atitude negativista recusando novamente alimentar-se. Instituido novamente tratamento antidepressivo e neuroléptico (haloperidol, 3 mg/dia). Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG realizado em repouso vigil com traçado de baixa voltagem, irregular e com predomínio de actividades lentas sem focalização. TC cerebral, sem atrofia cerebral difusa, alargamento dos cornos frontais por atrofia dos núcleos caudados. No segundo internamento é realizada nova punção lombar, com aumento de proteínas (95 mg%) com perfil misto (redução da pré-albumina e globulina gama e aumento moderado da globulina gama), citomorfologia normal e exame bactereológico negativo, TC cerebral idêntico ao anterior assim como o EEG. No terceiro internamento é repetida punção lombar com normalização da concentração e perfil das proteínas do LCR.

História Clínica Nº 5 (H5)

Identificação: ERS, 32 anos , sexo feminino, tecedeira , casada, natural de Paredes.

História da doença: Há cerca de 8 anos começa a referir irritabilidade fácil com agressividade em relação aos filhos, choro fácil com sentimento de tristeza, anorexia e insónia total, relacionada com a morte acidental do seu único irmão. Esta sintomatologia foi-se mantendo ao longo do tempo associada a cefaleias permanentes. No entretanto, não sabendo referir bem quando, começa a notar dificuldade na realização das suas tarefas habituais tanto profissionais como domésticas. Há quatro anos começa a apresentar movimentos involuntários que lhe são referidos pelas pessoas que com ela conviviam, mas não notados espontaneamente. A doente refere que não gostava de sair só com medo de cair. Todas estas queixas foram evoluindo até a data do internamento, embora com incapacidade para a sua profissão; na data da 1ª observação a doente ainda conseguia fazer as actividades do dia-a-dia em casa sem auxílio. Após o internamento a doença foi evoluindo com incapacidade mesmo para as tarefas mais simples do dia-a-dia por falta de iniciativa, já que se estimulada ainda realizava praticamente todas as tarefas caseiras correctamente embora com lentidão. Internado passados 4 anos após a primeira observação, após abandono da consulta, por agravamento do seu estado e na tentativa de resolver o seu problema social.

Antececentes pessoais e familiares: Em relação ao parto e gestação desconhece antecedentes, teve problemas de aprendizagem tendo concluido a 3ª classe com 13 anos. Apesar desta dificuldade adiquiriu a capacidade de escrita, leitura e cálculo. Casou com 19 anos e teve 1 filho de parto eutócico. Antecedentes familiares dificeis de obter, contudo é prima direita da doente H6 e tanto quanto se conseguiu saber a mãe da doente (irmã do pai da doente H6) teria sintomatologia muito semelhante à da doente.

Observação e exames complementares: Doente com bom estado geral, com aspecto cuidado no seu arranjo pessoal, bem orientada no espaço e pessoas e com desorientação no tempo.

Tenta colaborar no exame mas com uma atenção dispersa e francas alterações da compreensão. Entrevista dificil com falta de iniciativa por parte da doente, que prefere responder que não sabe a tentar executar as tarefas que lhe são propostas. Choro e riso inapropriado. Movimentos coreicos generalizados, com frequência moderada e pouco amplos mais notórios nos músculos da face. Bradicinésia com falta de iniciativa motora e lentificação do movimento. Rigidez e hiperreflexia generalizada com reflexos cutâneo-plantares flexores. Ausência de reflexos primitivos. Quatro anos após agravamento da intensidade dos movimentos coreicos que são evidentes, agravamento da lentificação do movimento voluntário e da deterioração cognitiva. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral e RMN com atrofia dos caudados.

História Clínica Nº 6 (H6)

Identificação: LGR, 49 anos , sexo feminino, doméstica, natural de Paredes.

História da doença: Refere ter sido sempre saudável até há doze anos quando após o parto do seu terceiro filho começa com movimentos involuntários que se foram agravando ao longo do tempo sem referir mais queixas tais como perda das poucas capacidades mentais anteriormente adiquiridas ou alterações emocionais. Não sabe referir por onde os movimentos se iniciaram, sabe apenas que foram piorando. Na altura do internamento, com doze anos de evolução apresentava uma coreia generalizada totalmente incapacitante, obrigando-a em casa a permanecer no leito embora caminhe com auxilio, mas apesar disto é capaz de orientar a casa com a mesma capacidade de sempre.

Antecedentes pessoais e familiares: Doente proveniente de um estrato social pobre. Os pais faleceram cedo não conhecendo a doente como decorreu a sua infância. Analfabeta. Trabalhou sempre em casa e na lavoura. Casou aos 20 anos e tem cinco filhos com idades compreendidas entre os 18 e os 9 anos. Antecedentes familiares ver história referente ao caso H5.

Observação e exames complementares: Doente consciente, emagrecida, bem orientada no espaço, tempo e pessoas, aspecto pouco cuidado com discurso muito entrecortado pouco perceptível mas coerente e bem organizado. Movimentos coreicos generalizados, contínuos e amplos incapacitando a doente de realizar com eficácia os movimentos voluntários. Marcha impossível sem ajuda, com ajuda marcha de base alargada, com passos irregulares muito prejudicada pelos movimentos coreicos permanentes e amplos. Apesar de tudo o movimento voluntário é rápido. Tono muscular normal, hiperreflexia e reflexo cutâneo-plantar flexor bilateralmente, ausência de reflexos primitivos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do

padrão de normalidade. Reacções serológicas de sífilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral com atrofia dos caudados. RMN mostra depósitos de ferritina nos gânglios da base e atrofia do núcleo caudado.

História Clínica Nº 7 (H7)

Identificação: EPG, 52 anos, sexo feminino, costureira, casada, natural e residente no Porto.

História da doença: Há cerca de 4 anos começa a notar movimentos involuntários e dificuldade motora que a incapacitaram para a sua profissão, para a condução de automóvel e inclusivé lhe perturbavam algumas tarefas caseiras. Um ano depois, começa a apresentar sintomatologia de tipo depressivo (choro fácil, ansiedade e irritabilidade marcada, anorexia e emagrecimento acentuado e insónia) que se foi agravando associando-se a ideação suicida o que motivou o seu internamento em hospital psiquiátrico durante seis meses do qual teve alta melhorada e medicada com maprotilina 75 mg/dia. A sua situação foi-se agravando progressivamente, com agravamento dos movimentos involuntários e agravamento da dificuldades motora, mas mantinha as tarefas domésticas e fazia compras sem ajuda. Quatro anos após, na altura da 2ª observação mantinha apenas capacidade para a sua higiene diária, vestia-se sem ajuda mas não conseguia manter o governo da casa necessitando de ajuda permanente.

Antececentes pessoais e familiares: Nascida de parto eutócico de termo, com normal desenvolvimento psicomotor, tendo concluido a 4ª classe com bom aproveitamento aos dez anos. Por razões familiares abandonou os estudos tendo aos 15 anos feito um curso de costura com a duração de três anos. Casou aos 18 anos mantendo relações matrimoniais harmoniosas, exerceu a sua profissão de forma regular não notando qualquer incapacidade nomeadamente na condução de automóvel. A história familiar da doença é já conhecida desde o seu bisavô paterno, tendo o seu avô e o seu pai falecido com esta doença. Dos 7 tios paternos 3 tinha a doença e dos 8 irmãos 4 apresentam sintomatologia semelhante à da doente.

Observação e exames complementares: Paciente com bom estado geral, obesa, cuidada no seu arranjo pessoal, com idade aparente correspondente à real, consciente e bem orientada. Atitude colaborante com um discurso espontâneo adequado, coerente e bem organizado abordando temática relacionada com a sua doença e denotando grande preocupação pelo possível atingimento dos filhos pela doença. Atenção captável e sustentável. Memória recente e remota relativamente preservada, não se apurando alterações da percepção e dos juizos. Doente com movimentos coreicos frequentes pouco amplos generalizados atingindo de forma discreta o movimento, a expressão verbal e a marcha. Falta de iniciativa motora com lentificação do movimento e dificuldade ligeira na realização dos movimentos finos e dos alternados. Tono muscular normal, reflexos osteo-tendinosos normais e reflexos cutâneo-plantares flexores. Ausência de reflexos primitivos. Na 2ª observação nota-se essencialmente deterioração do seu estado mental e discurso menos adequado com perda do juizo critico, atenção dispersa, agravamento da coreia e desiquilibrio na marcha. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores

normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral com atrofia dos caudados. RMN mostra depósitos de ferritina nos gânglios da base e atrofia do núcleo caudado.

História Clínica Nº 8 (H8)

Identificação: FPG, 36 anos, serralheiro reformado há cerca de 10 anos, solteiro, natural do Porto.

História da doença: Há cerca de dez anos começou com crises de agressividade que alternavam com crises de apatia profunda e ao mesmo tempo foi notado movimentos das mãos descritos como "se estivesse a fazer crochet". Foi observado num hospital psiquiátrico e medicado provavelmente como neurolépticos. Desde essa altura deixou de trabalhar e permaneceu em casa sem fazer nada, a maior parte do tempo deitado, sendo necessário incitá-lo ou mesmo pressioná-lo para que exercesse qualquer actividade. Abandonou todos os seus passatempos e foi perdendo capacidades anteriormente adiquiridas tais como as relacionadas com a sua profissão. Ao mesmo tempo a família notava que cada vez tinha menos movimentos espontâneos e a sua marcha tornou-se vagarosa e com passos pequenos e desiquilibrio fácil.

Antececentes pessoais e familiares: Nasceu de parto eutócico, sem antecedentes patológicos durante a infância. Foi muito novo para Angola tendo feito lá a intrução primária e o ciclo preparatório sem dificuldades, após o que apreendeu a arte de serralheiro mecânico, sendo um bom profissional. Emigrou aos 18 anos para a Africa do Sul tendo sido repatriado um ano depois por toxicomania que abandonou desde então. Acidente de viacção aos 22 anos sem traumatismo craneano. Antecedentes familiares ver história nº 7

Observação e exames complementares: Doente emagrecido, com um aspecto cuidado. Atenção dispersa e dificilmente captável, discurso pobre e muito repetitivo com voz monocórdica, memória recente e remota aparentemente conservada, lentificação marcada de todo o processo mental que é difícil iniciar. Bradicinésia acentuada, com postura e marcha de tipo parkinsónico, dificuldade em realizar movimentos finos e alternados. Movimentos coreicos essencialmente das mãos ocasionais e pouco amplos. Rigidez e hiperreflexia generalizada, reflexos cutâneo-plantares flexores bilateralmente. Ausência de reflexos primitivos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral com atrofia dos caudados.

História Clínica Nº 9 (H9)

Identificação: MJR, 69 anos, sexo feminino, doméstica, natural e residente em Gondomar.

História da doença: Início de movimentos involuntários há cerca de 10 anos com evolução

progressiva. Não refere perda das suas capacidades intelectuais e consegue perfeitamente governar a sua casa apesar da dificuldade motora provocada essencialmente pelos movimentos. Medicada co trihexifenidilo 2 mg/dia, nunca foi medicada com neurolépticos.

Antececentes pessoais e familiares: Refere ter sido sempre saudável até a data do início da doença. Segundo informações da doente, o seu bisavô paterno teria falecido com mais de 70 anos, apresentava movimentos muito semelhantes aos da doente. O pai faleceu acidentalmente aos 53 anos aparentemente sem doença, deconhece se algum dos irmãos do pai teria a doença pois emigraram para o Brasil. Um dos irmãos da doente com 60 anos de idade foi observado na consulta e apresentava movimentos coreicos difusos e de intensidade ligeira, mas não aceitou manter-se na consulta. Durante o internamento, uma filha que apresentava antecedentes psiquiátricos suicidou-se.

Observação e exames complementares: Doente consciente, bem orientada, coloborante no exame com um discurso de conteúdo adequado apresentando-se com um humor de acordo com a situação.. Bom estado de nutrição com aspecto cuidado sob o ponto de vista de higiene e arranjo pessoal. Coreia generalizada de amplitude grave interferindo em toda a actividade motora da doente. Realiza movimentos alternados. Tono muscular diminuído, reflexos profundos normais e cutâneo-plantares flexores. Sem reflexos primitivos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral normal, RMN sem evidência de atrofia dos núcleos caudados.

História Clínica Nº 10 (H10)

Identificação: EPSD, 54 anos, sexo feminino, natural Vila Nova de Famalicão.

História da doença: Aos 35 anos, idade em que começou a apresentar comportamentos inadequados, ideias e tentativas de suicidio. Pouco tempo depois começa a apresentar movimentos involuntários generalizados que pela descrição pareciam ser movimentos coreicos. A doença foi evoluindo progressivamente com maior dificuldade em realizar as tarefas do dia-a-dia e aos 45 anos apresenta um episódio de perda da força muscular à esquerda, interpretado como AVC, de que recuperou parcialmente. A partir desta altura há um agravamento dos movimentos involuntários e a doente começa a apresentar uma perda das capacidades intelectuais. Apresentava alterações da fala que se foram agravando, tornando-se o discurso com o tempo praticamente inteligível e deixou de realizar tarefas simples embora obedecesse a ordens verbais simples. A situação foi-se agravando até que a partir dos 50 anos começou a ter francas dificuldades de marcha com quedas frequentes, alterações da deglutição e perturbações do sono (insónia total rebelde). Desde há cerca de 2 meses acamou.

Antececentes pessoais e familiares: Frequentou a escola primária mas não terminou a 4ª classe, sabia ler e escrever e fazia contas simples. Não há conhecimento de doenças graves

anteriores. O pai da doente terá falecido com cerca de 60 anos de idade, num hospital psiquiátrico, demenciado e com movimentos involuntários, com o diagnóstico de provável doença de Huntington. Tem seis irmãos dois dos quais apresentam quadros clínicos semelhantes embora com menor grau de gravidade, tratados em hospitais psiquiátricos com a informação de quadro clínico compatível de doença de Huntington. Tem quatro filhos, um dos quais está em tratamento psiquiátrico.

Observação e exames complementares: Doente acamada, apresentado movimentos coreicos ocasionais de intensidade média e generalizados que se agravam, tornando-se contínuos e amplos quando se estímula a doente verbalmente. Emagrecida com mau estado geral. Discurso pobre, pouco compreensivel, entendendo-se apenas algumas palavras, obedece a ordens verbais simples e nomeia objectos que se mostram. Os movimentos voluntários são rápidos mas entrecortados com movimentos coreicos. Alimenta-se bem mas com disfagia franca. Totalmente dependente tanto na alimentação como higiene. Algaliada. Tono muscular sem alterações, reflexos osteo-tendinosos vivos e CP flexores. Sem reflexos primitivos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral com atrofia cerebral generalizada, redução do volume dos caudados que praticamente não se distinguem, enfarte parietal direito.

História Clínica Nº 11 (H11)

Identificação: JCJ, 47 anos, sexo masculino, estivador, residente em Matosinhos.

História da doença: Desde há cerca de 7 anos refere incapacidade para estar quieto sendo-lhe notado pela família a presença de movimentos involuntários que o incapacitaram de exercer a sua profissão. A acompanhar esta sintomatologia o doente isolou-se em casa, perdendo o interresse pelos seus passatempos habituais embora ainda leia o jornal, veja televisão. Mantêm-se em casa o dia todo inactivo mesmo quando estimulado recusa alegando incapacidade.

Antecedentes pessoais e familiares: Foi sempre saudável existindo apenas referência a gastrite comprovada endoscopicamente. Foi abandonado pelos pais em criança. Completou a 4ª classe aos 10 anos. Dos antecedentes familiares, apenas foi possivel comprovar sintomatologia compatível com doença de Huntington, na ficha clínica de uma irmã da mãe que vivia na vizinhança e faleceu no Hospital de S.João.

Observação e exames complementares: Doente emagrecido, com aspecto cuidado, orientado no tempo, no espaço e pessoas. discurso pobre mas de conteúdo normal. Dificuldade em contar coerentemente a história da doença, sendo a maioria das informações fornecidas pela mulher. Anorexia, insónia e perda de peso. Movimentos coreicos de intensidade moderada, generalizados. Falta de iniciativa motora com lentificação moderada do movimento. Tono muscular normal com reflexos osteo-tendinosos vivos e simétricos e cutâneo-plantares

flexores. Ausência de reflexos primitivos. Exames complementares: Hemograma completo dentro do padrão normal sem acantócitos. Actividade da creatinofosfoquínase, cobre sérico e urinário (24 horas) e ceruloplasmina dentro de valores normais. Estudo citomorfológico do LCR normal, concentração e eletroforese das proteínas do LCR dentro do padrão de normalidade. Reacções serológicas de sifilis negativas no soro e LCR. EEG, baixa voltagem e irregular. TC cerebral e RMN com atrofia dos caudados.

2-ESCALA DE INCAPACIDADE FUNCIONAL (ESTADIO)

(Shoulson I (1981) Huntington's disease: Funcional capacities in patients treated with neuroleptic and antidepressant drugs. Neurology, 31, 1333-1335)

Capacidade para exercer a profissão:

Normal=3; Diminuida=2; Marginal=1, Incapaz=0

Capacidade em lidar com responsabilidades financeiras:

Completa=3; Requer uma ajuda pequena=1; Requer uma ajuda grande=2; Incapaz=0

Capacidade para lidar com responsabilides domésticas:

Completa=2; Diminuida=1; Incapaz=0

Capacidade na realização das tarefas do dia-a-dia:

Completa=3; Discretamente diminuida=2; Moderadamente diminuida=1; Gravemente diminuida=0

Local onde pode ser assistido:

Em casa=2; Em casa com apoio=1; Necessita de apoio hospitalar=0

Estadio I=11-13; Estadio II=7-10; Estadio III=3-6; Estadio IV=1-2 Estadio V=0

3-"MINI MENTAL STATE EXAMINATION"

(Folstein MF, Susan SE and McHugh (1975). MINI MENTAL STATE: A practical method for grading the cognitive state of patients for clinician. J. Psichiat. Res, 12, 189-198)

1-Orientação: Pontuação (0-10)

Qual é o mês, ano, dia, dia da semana, estação do ano.
Como se chama a cidade, a casa, o país, a capital, o andar.

2-Registo: Pontuação (0-3)

Nomear 3 objectos - MAÇÃ, DINHEIRO, MESA
Dizer uma palavra por segundo. Pedir para repetir (1 ponto por palavra)
Mandar repetir até decorar e registar o número de tentativas.

3-Atenção e cálculo: Pontuação (0-5)

Séries de 100-7=93,86,79,72,65; ou 100-3=97,94,91,88,85; ou soletrar TOMAR ou MUNDO ao contrário.

4-Evocação: Pontuação (0-3)

Evocar as palavras de 2

5-Linguagem: pontuação (0-10)

a)Nomear relógio e lápis, que se mostra. Pontuação (0-2)
b)Repetir "nem mas nem meio mas". Pontuação (0-1)
c)Executar: -pegue numa folha de papel na mão direita, dobre-a ao meio, ponha-a nos joelhos. Pontuação (0-3)
d)Ler e executar:"FECHE OS OLHOS". Pontuação (0-2)
e)Escrever uma frase completa (pode conter erros gramaticais e de pontuação). Pontuação (0-1)
f)Copiar o desenho (dois pentágonos que se interseptam num losângulo, que devem conter 10 angulos) Pontuação (0-1)

TOTAL 30 pontos. (Normal- 24-30)

4-EXAME NEUROLOGICO QUANTITATIVO

(Adaptado de Folstein SE, Jensen B, Leigh RJ e Folstein MF (1983) The measurement of abnormal movement: methods developed for Huntington's disease. Neurobehavioral Toxicology and Teratology, 5, 605-609).

1-MOVIMENTOS CONJUGADOS OCULARES (MCO) (16)

Olhar Conjugado Lateral:

Perseguição:

Extensão 0=Normal 1=Incompleta 2=Não faz

Harmonia 0=Movimento contínuo 1=Movimento irregular 2=Não faz

Olhar Conjugado Vertical:

Perseguição:

1-Extensão 0=Normal 1=Incompleta 2=Não faz

2-Harmonia 0=Movimento contínuo 1=Movimento irregular 2=Não faz

Movimentos Sacádicos:

Velocidade 0=Normal 1=Lento 2=Não faz

Supressão pelo pestanejo: (se o doente pestanejar durante a prova pedir para parar).

0=Não pestaneja/consegue parar 1=Não consegue parar 2=Não executa.

Harmonia. 0=Movimento contínuo 1=Movimento irregular 2=Não faz

Movimento lateral da cabeça. (Pedir para não mexer a cabeça)

0=Nenhum 1=Cabeça move-se 2=Não executa

2-MÍMICA FACIAL (5) Pedir ao doente para imitar o que fazemos e pontuar

0=Executa 1=Não executa

1-encher a boca de ar, 2-empurrar a bochecha com a língua, 3-franzir o sobrolho. 4-piscar um olho (o outro olho pode mexer mas não fechar), 5-movimentos rápidos da língua (tocar com a língua alternadamente nos cantos da boca-4/s).

3-IMPERSISTÊNCIA MOTORA (4)

a)encerramento dos olhos. b)protusão da língua.

0=mantem durante 20 s. 1=não mantem durante 20 s. 2=não executa.

4-CONVERSAÇÃO ESPONTANEA (8)

Ritmo. 0=normal 1=com pausas/transições inesperadas. 2=mudo

Velocidade. 0=normal 1=lenta e rápida (irregular) 2=mudo.

Clareza.
0=normalmente compreensível. 1=tem que se ouvir com atenção e pedir para repetir.
2=muitas repetições, mas entende-se. 3=incompreensível. 4-mudo.

5-TONO (2) (Pontuar membros e nuca)

0-normal 1=diminuído 2=aumentado

6-FORÇA (2)

0=normal 1=diminuida 2=não pode ser testada(doença avançada)

7-REFLEXOS PROFUNDOS (3) Bicipital, Rotuliano, Aquiliano. Pontuar pela média dos 3

0=normal 1=abolidos 2=vivos sem clónus 3=vivos com clónus

8-RESPOSTA PLANTAR (1)

0=flexora 1=extensora

9-PROVA DEDO-NARIZ (3)

0=Rápido, suave, correcto. 1=lento mas correcto.

2=dismetria. 3=não executa o comando.

10-BATIMENTO ALTERNADO POLEGAR-INDICADOR (6) Pontuar à direita e esquerda

0 >4/s ritmico 1=3/s ou + irregular 2-<3/s. 3=não executa.

11-DIADOCOCINÉSIA (6) Pontuar à direita e esquerda

0->3/S rítmico 1-2/s arrítmico 2-<2/s. 3=não executa o comando.

12-COREIA (25)

Pontuar em repouso, durante a conversção, durante o movimento, durante o stress

0=ausente
1=moderada e ocasional.
2=frequente pouco ampla.
3=contínua e pouco ampla.
4-contínua, grave, mas o doente ainda é capaz de executar alguns movimentos voluntários.
5-totalmente incapacitante.

Juntar 5 se generalizada.

13-MARCHA LIVRE (4)

0=normal 1=base alargada 3=base alargada com desvio

3=marcha com ajuda 4=incapaz

14-PARAGEM/ROTAÇÃO (3)

0=para sob comando e roda numa pequena área.
1=para mas balanceia e hesita, alarga a base ou move os pés.
2-demora 2 a 3 passos a parar e roda lenta e desastradamente.
3-incapaz de andar.

15-MARCHA PÉ-ANTE-PÉ (4)

0=sem desvio ou balanceio
1=1 a 3 desvios ou balanceio exagerado do tronco
2=> a 3 desvios mas completa 10 passos.
3=não completa a prova embora tente
4=não consegue nem tenta

16-TOULOUSE-VURPAS(SNOUT)/ PREENSÃO PATOLOGICA (1)

0=ausente 1=presente

17-POSTURA (3)

0=normal 1=um pouco parada 2=parada com o olhar para baixo
3=acamado sem movimento

18-BRADICINÉSIA (4)

0=velocidade normal dos mov. voluntários. 1=lentidão discreta na execução.

2=lentidão moderada na execução. 3=lentidão intensa na execução.

4=acamado sem movimento.

ESCALA DE INCAPACIDADE MOTORA (EIM)

Mimica facial (5)+Impersitência motora (4)+Clareza na conversação espontânea(4)+Resposta plantar (1)+Diadococinésia (6)+Marcha livre (4)+Paragem/rotação (3)+reflexos primitivos (1)= 28

VII- Bibliografia

1. **Albin RL, Reiner A, Anderson KD, Penney JB and Young AB (1990).** Striatal and Nigral neurons subpopulations in rigid Huntington's disease: Implications for functional anatomy of chorea and rigidity-akinesia. Annals of Neurology, **27**, 357-365

2. **Albin RL, Young AB and Penney JB (1989).** The functional anatomy of basal ganglia disorders. Trends in Neurosciences, **12**, 366-375

3. **Albin RL, Young AB, Penney JB, Handelin B, Balfour R, Anderson KD, Merkel DS, Tourtellotte WW and Reiner A (1990).** Abnormalities of striatal projectionm neurons and N-methyl_d_aspartate receptors in presymptomatic Huntington's disease. New England Journal od Medecine, 322, 1293-1298

4. **Alexander GE and Crutcher MD (1990).** Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substracts of parallel processing. Trends in Neurosciences, **13**, 266-271

5. **Aronin N, Cooper PE, Lorenz LJ, Bird ED, Sagar SM, Leeman SE and Martin JB (1983).** Somatostatin is increased in the basal ganglia in Huntington'disease. Annals of Neurology, **13**, 519-526

6. **Azzaro AJ, King J, Kotzuk J, Schoepp DD, Frost J and Schochet S (1985).** Guinea striatum as a model of human dopamine deamination: the role of monoamine oxidase isozyme ratio, localization, and affinity for substrate in synaptic dopamine metabolism. Journal of Neurochemistry. **45**, 949-956.

7. **Badoer E, Wurth H, Turck D, Quadri F, Itoi K, Dominiak P, and Unger Th (1989).** The K+-induced increases in noradrenaline and dopamine release are accompanied by reductions in the release of their intraneuronal metabolites from the rat anterior hypothalamus. An in vivo brain microdialysis study. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **339**, 54-59.

8. **Bamford KA, Caine ED, Kido DK, Plassche WM and Shoulson I (1989).** Clinical-Pathological correlation in Huntington's disease. Neurology, **39**, 796-801

9. **Bannon MJ and Roth RH (1983).** Pharmacology of mesocortical dopamine neurons. Pharmacological Reviews, **35**, 53-68.

10. **Barbeau A. (1979).** Update of the biochemestry of Huntigton'chorea. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, pp 449-461, Raven Press, New York

11. **Barbeau A. (1986)**. Parkinson's disease: clionical features and etiopathology. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken PJ, Bruyn GW and Klawans HL editors, **vol 49** (5), 87-152, Elsevier Science Publishers, Amesterdam.

12. **Barnett A (1986)**. Review on dopamine receptors. Drugs of Future, **11**,49-55

13. **Barr AN, Fisher JH, Koller WC, Spunt AL and Singhal A (1988)**. Serum haloperidol concentration and choreiform movements in Huntington's disease. Neurology, **38**, 84-88

14. **Barr AN, Heinze W, Mendoza JE and Perlik S (1978)**. Long term treatment of Huntington's disease with L-glutamate and pyridoxine. Neurology, **28**, 1280-1282

15. **Bartholini G, Zivkovic B and Scatton B (1989)**. Dopaminergic neurons: basic aspects. In *Handbook of Experimental Pharmacology-Cathecolamines*, Tredlenburg U and Weiner N editors. **90/II**, 277-318 Spinger-Verlag

16. **Bassi S, Albizatti MG, Corsini GU, Frattola L, Piolti R, Suchy I and Trabucchi M (1986)**. Therapeutic experience with transdihydrolisuride in Huntington's disease. Neurology, **36**, 984-986

17. **Beal MF (1989)**. Neurochemistry of Huntington's disease. Journal of Neurochemistry, **52**, suppl S12

18. **Beal MF, Bird ED, Langlais PJ and Martin JB (1984)**. Somatostatin is increased in the nucleus accumbens in Huntington's disease. Neurology, **34**, 663-666

19. **Beal MF, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Malloy JR, Birc ED and Martin JB (1988a)**. A detailed examination of substance P in pathological graded cases of Huntington's disease. Journal of Neurological Sciences **84**, 51-61

20. **Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ and Martin JB (1986)**. Replication of neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. Nature, **321**, 168-171

21. **Beal MF, Knowall NW, Swartz KJ, Ferrante RJ and Martin JB (1988b)**. Systemic approaches to modifying quinolinic acid striatal lesions in rats. Journal of Neurosciences, **8**, 3901-3908

22. **Beal MF, Mazurec MF, Swartz KJ, McGarvey U, Bird ED and Martin JB (1988c)**. Somatostatin and neuropeptide Y concentrations in pathological graded cases of Huntington's didease. Annals of Neurology, **23**, 562-569

23. **Berent S, Giordani B, Lehtinen S, Markel D, Penney J, Btchel HA, Starosta-Rubinstein S, Hichwa R and Young AB (1988)**. Positron Emission Tomographic Scan investigations of Huntington's disease: cerebral metabolic correlates of cognitive function. Annals of Neurology, **23**, 541-546

24. **Bernheimer H, Birkmayer W, Hornykiewicz O and Seitelberger F (1973)**. Brain dopamine and syndromes of Parkinson and huntington. Clinical, morphological and neurochemical correlations. Journal of Neurological sciences, 20, 415-455

25. **Bernheimer H and Hornykiewicz O (1973)**. Brain amines in Huntington's chorea. In *Advances in Neurology* . Barbeau A, Chase TN and Paulson GW editors, **vol. 1**, 525-532, Raven Press, New York

26. **Bertilsson L, Haglund K, Östman J, Rawlins MD, Ringberger VA and Sjöqvist F (1977)**. Monoamine metabolites in cerebrospinal fluid during treatement with clonidine or alprenelol. European Journal of Pharmacology, **11**, 125-128.

27. **Bird ED (1980)**. Chemical Pathology of Huntington's Disease. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, **20**, 533-551.

28. **Bird ED and Iversen LL (1974)**. Huntington's chorea. Post-mortem measurements of glutamic acid descarboxylase, choline acetyltransferase and dopamine in basal ganglia. Brain, **97**, 457-472.

29. **Bloem BR, Irwin I, Buruma OJS, Haan J, Roos RAC, Tetrud JW and Langston JW (1990)**. The MPTP model: versatile contributions to the treatment of idiopathic Parkinson's disease. J.Neurol. Sci., **97**, 273-293

30. **Bondareff W, Mountjoy CQ and Roth M (1982)**. Loss of neurons of origin of adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. Neurology, **32**, 164-168

31. **Boyce S, Clarke CE, Luquin R, Peggs D, Robertson RG, Mitchell IJ, Sambrook MA and Crossman AR (1990)**. Induction of chorea and dystonia in parkinsonian primates. Movements disorders, **5**, 3-7

32. **Boyce S, Rupniak NMJ, Steventon MJ, Iversen SD (1990).** Differencial effects of D_1 and D_2 agonists in MPTP-treated primates: functional implications for Parkinson's disease, Neurology, **40**, 927-933

33. **Braestrup C (1977).** Biochemical differenciation of amphetamine *vs* methylphenidate and nomifensine in rats. Journal of Pharmacy and Pharmacology, **29**, 463-470.

34. **Brandt J, Folstein SE and Folstein MF (1988).** Differencial cognitive impairment in Alzheimer's disease and Huntington's disease. Annals of Neurology, **23**, 555-561

35. **Brodie BB, Costa E, Dlabac A, Neff NH and Smookler HH (1966).** Application of steady state kinetics to the estimation of synthesis rate and turnover time of tissue catecholamines. J. Pharmacol. Exp. Ther. **154**, 493-498.

36. **Brooks DJ, Salmon EP, Mathias CJ, Quinn N, Leenders KL, Bannister R, Marsden CD and Frackowiak RSJ (1990).** The relationship between locomotor disability, autonomic dysfunction, and the integrity of the striatal dopaminergic system in patients with multiple system atrophy, pure autonomic failure, and Parkinson disease, studied with PET. Brain, **113**, 1539-1552

37. **Bruyn GW, Bots GThAM and Dom R (1979).** Huntington's chorea: current neuropathological status. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, pp 83-94, Raven Press, New York

38. **Bruyn RPM and Stoof JC (1990).** The quinolinic hypothesis in Huntington's chorea. Journal of Neurological Sciencess **95**, 29-38

39. **Bruyn GW and Went LN (1986).** Huntington's chorea. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken PJ, Bruin GW and Klawans HL editors, **vol 49**, pp. 267-313, Elsevier Science Publishers, Amesterdam.

40. **Butterfield DA, Oeswien JQ, Prunty ME, Hisle KC and Markesbery WR (1978).** Increased sodium plus potassium adenosine triphosphatase activity in erithrocyte membranes in Huntington's disease. Annals of Neurology, **4**, 60-62

41. **Butterworth J, Yates CM, Reynolds GP (1985).** Distribuition of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gama-glutamyl transpeptidase in *post-mortem* brain from Huntington's disease and agonal cases. Journal of Neurological Sciences, **67**, 161-171

42. **Butterworth J, Yates CM and Simpson J (1983).** Phosphate-activated glutaminase in relation to Huntington's disease and agonal state. Journal of Neurochemistry, **41**, 440-447

43. **Caine ED and Shoulson (1983).** Psychiatric syndromes in Huntington's disease. American Journal of Psychiatry, **140**, 161-171

44. **Caraceni T, Calderini G, Conzolatione A, Riva E, Algeri S, Girotti F, Spreafico R, Branciforti A, Dall'Olio A and Morselli PL (1977).** Biochemical aspects of Huntington's chorea. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **40**, 581-587.

45. **Carlsson A (1959).** Occurrence, distribuition and physiological role of cathecolamines in the nervous system. Pharmacological Reviews, **11**, 300-304

46. **Carlsson M and Carlsson A (1990).** Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia- implications for schizophrenia and Parkinson's disease. Trends in Neurosciences, **13**, 272-276

47. **Carpenter MB (1986).** Anatomy of the basal ganglia. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken PJ, Bruyn GW and Klawans HL editors, pp. 1-18, Elsivier Publishers, Amsterdan

48. **Chase TN (1973).** Biochemical and pharmacological studies of monoamines in Huntington's chorea. In *Advances in Neurology* Barbeau A, Chase TN and Paulson GW editors,**vol. 1**, pp 533-542, Raven Press, New York.

49. **Chevalier G and Deniau JM (1990).** Desinhibition as a basic process in the expression of striatal functions. Trends in Neurosciences, **13**, 277- 280

50. **Choi DW, Viseskul V, Amirthanayagam M and Monyer H (1989).** Aspartate neurotoxicity on cultured cortical neurons. Journal of Neuroscience Research, **23**, 116-121

51. **Clarke CE, Boyce S, Robertson RG, Sambrook MA and Crossman AR (1989).** Drug-induced dyskinesia in primates rendered hemiparkinsonian by intracarotid administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Journal of Neurological Sciences., **90**, 307-314

52. **Clarke CE, Sambrook MA, Mitchell IJ and Crossman AR (1987).** Levodopa-induced dyskinesia and response fluctuations in primates rendered parkinsonian with 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). Journal of Neurological Sciences.,**78**, 273-280

53. **Collewijn H, Went LN, Tamminga EP and Vegter-Van der Vlis M (1988).** Oculomotor defect in patients with Huntington's Disease and their offsprings. Journal of Neurological Sciences, **86**, 307-329

54. **Commissiong JW (1985).** Monoamine metabolites: their relationship and lack of relationship to monoaminergic neuronal activity. Biochem. Pharmacol. **34**,1127-1131.

55. **Conneally PM (1984).** Huntington's disease: Genetics and epidemiology. American Journal of Human Genetics, **36**, 506-526

56. **Coyle JT and Schwarcz R (1976).** Lesion of striatal neurones with kainic acid provides a model for Huntington's chorea. Nature, **263**, 244-246.

57. **Crawley JN, Huttox SE, Maas JW and Roth RH (1978).** 3-methoxy-4-hydroxyphenylethyleneglycol increase in plasma after stimulation of Locus Coeruleus. Brain Research, **141**, 380-384.

58. **Cross A and Rossor M (1983).** Dopamine D_1 and D_2 receptores in Huntington's disease. European Journal of Pharmacology, **88**, 223-229

59. **Crossman AR, Mitchell IJ, Sambrook MA and Jackson A (1988).** Chorea and mioclonus in monkey induced by gama-aminobutyric acid antagonist in the lentiform complex; the site of drug action and a hypothesis for the neural mechanisms of chorea. Brain, **111**, 1211-1233

60. **Cunha L (1979).** Ácido homovanílico no líquido céfalo-raquidiano e patologia extrapiramidal. Dissertação de Doutoramento apresentada à Faculdade de Medecina de Coimbra

61. **Cunha L, Gonçalves AF, Oliveira C, Diniz M and Amaral R (1983).** Homovanillic acid in the cerebrospinal fluid of Parkinsonian patients. Can. Journal of Neurological Sciences., **10**, 45-46

62. **Cunha L, Oliveira CR, Diniz M, Amaral R, Gonçalves AF and Pio-Abreu J (1981).** Homovanillic acid in Huntington's disease and Sidenham's chorea. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **44**, 258-261

63. **Curzon G (1975).** CSF homovanillic acid: an index of dopaminergic activity. In *Advances in Neurology*, Edited by Calne D, Chase TN and Barbeau A., **vol. 9**, 349-357. New York: Raven Press.

64. **Curzon G, Gumpert J and Sharpe D (1972).** Amine metabolites in the cerebrospinal fluid in Huntington's chorea. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **35**, 514-519.

65. **Curzon G, Hutson PH, Jackson A, Sahkian BJ and Sarna GS (1986).** Monitoring brain amines metabolism using CSF: validation of methoth and use in investigation of relationships with social behaviour. *Monitoring Neurotransmitter Release During Behaviour*. Joseph MH, Fillenz M, MacDonald IA and Marsden CA editors., pp. 120-132, Ellis Horwood, Chichester

66. **David AS, Jeste DV, Folstein MF and Folstein SE (1987).** Voluntary movement dysfunction in Huntington's Disease and tardive dyskinesia. Acta Neurologica Scandinavica, **75**, 130-139

67. **Dawbarn D and Picock CJ (1981).** Motor effects following aplication of putative excitatory amino acid antagonists to the region of the mesencephalic dopamine cell bodies in the rat. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **318**, 100-104

68. **de la Monte SM, Vonsattel JP and Richardson EP (1988).** Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, **47**, 516-525

69. **De Keiser J, Roos RAC, Ebinger G and Vauquelin G (1989).** Lack of GTP-insensitive D_2 dopamine receptors in Huntington's disease. Journal of Neurological Sciences., **92**, 329-335

70. **Dedek J., Baumes R., Tieu-Duc N, Gomeni R. and Korf J. (1979).** Turnover of free and conjugated (sulphonxy) dihydroxyphenylacetic acid in rat striatum. Journal of Neurochemistry., **33**,687-695.

71. **DeJong RS (1973).** The history of Huntington's chorea in the United States of America. In *Advances in Neurology*, Barbeau A, Chase TN and Paulson GW ed., **vol 1**, 19-27, Raven Press, New York.

72. **Denny-Brown D and Yanagisawa N (1976).** The role of basal ganglia in the initiation of movement. *In The Basal Ganglia*, Yahr MD editor, pp. 115-149, Raven Press, New York

73. **DiFiglia M (1990).** Excitatory injury of the neostriatum: a model for Huntington's disease. Trends in Neurosciences, **13**, 286-289.

74. **Earle KM (1973).** Pathology and experimental models of Huntington's chorea. In *Advances in Neurology*. Barbeau A, Chase TN and Paulson GW editors, **vol. 1**, 341-352, Raven Press, New York.

75. **Ellison DW, Beal MF, MazureK MF, Malloy JR, Bird ED and Martin JB (1987).** Amino acid transmitter abnormalities in Huntington's disease and the quinolinic acid animal models of Huntington's disease. Brain, **110**, 1657-1673

76. **Emson PC, Arregui A, Clement-Jones V, Sandberg BEB and Rossor M (1980).** Regional distribuition of methionine-enkephaline and substance P-like immunoreactivity in normal human brain and in Huntington's disease. Brain Reseasch, **199**, 147-160

77. **Enna SJ, Bennett JP, Bylund DB, Snyder SH, Bird ED and Iversen LL (1976).** Alterations of brain neurotransmitter receptor binding in Huntington's chorea. Brain Research , **116**, 531-537.

78. **Eslworth JD, Redmond DE and Roth RH (1982).** Plasma and cerebrospinal fluid 3-methoxy-4-hydroxiphenyl ethyleneglycol (MHPG) as an index of brain noradrenaline metabolism in primates. Brain Research, **235**,115-124

79. **Ferrante RJ, Beal MF, Kowall NW, Richardson EP and Martin JB (1987).** Sparing of acetylcholinesterase-containing striatal neurons in Huntington's disease. Brain Research, **411**, 162-166

80. **Ferrante RJ, Knowall NW, Beal MF, Martin JB, Bird ED and Richardson EP (1987).** Morphologic and histochemical characheristics of spared subset of striatal neurons in Huntington's disease. Journal of Neurophatologic adn Experimental neurology, **46**, 12-27

81. **Ferrante RJ, Knowall NW, Beal MF, Richardson EP, Bird ED and Richardson EP (1985).** Selective sparing of a class of striatal neurons in Huntington's disease. Science, **230**, 561-563

82. **Folstein SE, Abbott MR, Chase GA, Jensen BA and Folstein MF (1983).** The association of affective disorder with Huntington's disease in a case series and in families. Psychological Medecine, **13**, 537-542

83. **Folstein MF, Folstein SE and McHugh PR (1975).** "Mini-Mental State": a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. Journal of Psychiatric Research, **12**, 189-198.

84. **Folstein SE, Leigh RJ, Parhad IM and Folstein MF (1986).** The diagnosis of Huntington's disease. Neurology, **36**, 1279-1283

85. **Foster NL, Chase TN, Denaro A, Hare TA and Tamminga CA (1983).** THIP treatment of Huntington's disease. Neurology, **33**, 637-639

86. **Freed CR, Echizen H & Bhaskaran D (1986).** Serotonin metabolism and blood pressure regulation: Insights from brain tissue assays and in vivo electrochemical recording. In *Monitoring Neurotransmitter Release During Behaviour.* Joseph MH, Fillenz M, MacDonald IA & Marsden CA, editors, pp 134-143, Chichester: Ellis Horwood.

87. **Girotti F, Carella F, Scigliano G, Grassi MP, Soliveri P, Giovannini P, Parati E and Caraceni T (1984).** Effect of neuroleptic treatment on involuntary movements and motor performances in Huntington's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **47**, 848-852

88. **Glass PJ, Jankovic J and Borit A (1984).** Hemiballism and metastatic tumor. Neurology, **34**, 204-207

89. **Goldman-Rakic PS and Selemon LD (1990).** New frontiers in basal ganglia research. Trends in Neurosciences, **13**, 241-243

90. **Graybiel AM (1990).** Neurotransmitters and Neuromodulators in the basal ganglia. Trends in Neurosciences, **13**, 244-253

91. **Greenamyre JT, Penney JB and Young AB (1985).** Alterations in L-glutamate binding in Alzheimer's and Huntington's diseases. Science **277**, 1496-1499

92. **Groppeti A, Algeri S, Cattabeni F, Digiullo AM, Galli CL, Ponzio F and col. (1977).** Changes in specific activity of dopamine metabolites as evidence of a multiple compartimentation of dopamine in striatal neurons. Journal of Neurochemistry, **28**, 193-197.

93. **Growdon JH, Cohen EL, Wurtman RJ (1977).** Huntington's disease: Clinical and chemical effects of choline administration. Annals of Neurology, **1**,418-422

94. **Guilleminault C, Tharp BR and Cousin D (1973).** HVA and 5-HIAA CSF maesurements and 5HTP trials in some patients with involuntary movements. Journal of Neurological Sciencess, **18**, 435-441.

95. **Gusella JF, Wexler NS, Conneally PM, Naylor SL, Anderson MA, Tanzi RE, Watkins PC, Ottina K, Wallace MR, Sakaguchi AY, Young AB, Shoulson I, Bonilla E and Martin JB (1983).** A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. Nature, **306**, 234-238

96. **Hägglund J, Aquilonius S-M, Eckernas S-A, Hartvig P, Lundquist H, Gullberg P and Langstrom B (1987).** Dopamine receptor properties in Parkinson's disease and Huntington's chorea evaluated by positron emission tomography using 11C-N-methyl-spiperone. Acta Neurologica Scandinavica, **75**, 87-94

97. **Hammond P and Brimijoin S (1988).** Acetylcholinesterase in Huntington's disease and Alzheimer's disease; simultaneous enzyme assay and immunoassay of multiple brain regions. Journal of Neurochemistry, **50**, 1111-1116

98. **Hammond C, Féger J, Bioulac B,Souteyrand JP (1979).** Experimental hemiballism in the monkey produced by unilateral kainic acid lesions in corpus Luysi. Brain Research, 171, 577-592

99. **Hayden MR, Hewitt J, Stoessl AJ, Clark C, Ammann MJ and Martin WRW (1987).** The combined use of positron emission tomography and DNA polymorphisms for preclinical detection of Huntington's disease. Neurology, **37**, 1441-1447

100. **Hayden MR, Martin WRW, Stoessl AJ, Clark C, Hollenberg S, Adam MJ, Ammann MJ, Harrop R, Rogers J, Ruth T, Sayre C and Pate BD (1986).** Positron emission tomography in the early diagnosis of Huntington's disease. Neurology, **36**, 888-894

101. **Heal DJ, Prow MR, Buckett WR (1989).** Measurement of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol (MHPG) in mouse brain by h.p.l.c. with electrochemical detection, as an index of noradrenaline utilisation and pre-synaptic alfa2-adrenoceptor function. British Journal of Pharmacology **96**, 547-556.

102. **Hefter H, Hömberg V, Lange HW and Freund HJ (1987).** Impairment of rapid movements in Huntington's Disease. Brain, **110**, 585-612

103. **Heikkila RE and Manzino L (1984).** Behavioral properties of GBR12909, GBR 13069 and GBR 13098: Specific inhibitors of dopamine uptake. European Journal of Pharmacology, **103**, 241-248.

104. **Herdon H. and Nahorski S.R. (1987).** Comparison of radiolabelled and endogenous dopamine release from rat striatal slices: effects of electrical field stimulation and regulation by D_2-autoreceptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **335**, 238-242.

105. **Herdon H, Strupish J and Nahorski SR (1985).** Differences between the release of radiolabelled and endogenous dopamine from superfused rat brain slices: effects of depolarizing stimuli, amphetamine and syntheis inhibition. Brain Research, **348**, 309-320.

106. **Hertz L and Richardson JS (1984).** Is neuropharmacology merely the pharmacology of neurons - or are astrocytes important too? Trends in Pharmacological Sciences, July, 272-276

107. **Hodges JR, Salmon DP and Butters N (1991).** The nature of the naming deficits in Alzheimer's and Huntington's disease. Brain, 114, 1547-1558

108. **Hornykiewicz O (1976).** Neurohumoral interactions and basal ganglia function and dysfunction. In *The Basal Ganglia*, Yahr MD editor, pp. 269-280, Raven Press, New York

109. **Hoveney-Sion D, Kopin IJ, Stull RW and Goldstein DS (1989).** Effects of monoamine oxidase inhibitors on the levels of cathecols and homovanillic acid in striatum and plasma. Neuropharmacology, 28, 791-797

110. **Huntington G (1872).** On Chorea. In *Advances in Neurology*, Barbeau A, Chase TN and Paulson GW editors, **vol 1**, 33-35, Raven Press, New York.

111. **Huston PH, Sarna GS, Kantamaneni BD & Curzon G (1984).** Concurrent determination of brain dopamine and 5-hidroxytryptamine turnovers in individual freely moving rats using repeated samplings of cerebrospinal fluid. Journal os Neurochemistry, **43**,151-159

112. **Hyley CR and Bird ED (1974).** Decreased muscarinic receptor concentration in *post-mortem* brain in Huntington's chorea. Brain Research. **80**, 355-358

113. **Jankovic J and Orman J (1988)**. Tetrabenazine therapy of dystonia, chorea, tics, and other dyskinesias. Neurology, **38**, 391-394

114. **Jason GW, Pajurkowa EM, Suchowersky O, Hewitt J, Hilbert C, Reed J and Hayden MR (1988)**. Presymptomatic neuropsychological impairment in Huntington's disease. Archives of Neurology, **45**, 769-773

115. **Joyce JN, Lexow N, Bird E, Winokur A (1988)**. Organization of dopamine D_1 and D_2 receptors in human striatum: receptor autoradiographic studies in Huntington's disease and schizophrenia. Synapse, **2**, 546-557

116. **Kalén P., Strecker R., Rosengreen E. and Björklund A. (1988)**. Endogenous release of neuronal serotonin and 5-hydroxyindolacetic acid in the caudate-putamen of the rat as revealed by intra-cerebral dialysis coupled to high-performance liquid chromatography with flourometric detection. Journal of Neurochemistry., **43**, 1422-1435

117. **Kanazawa I, Bird ED, Gale JS, Iversen LL, Jessel TM, Muramoto O, Spokes EGS and Sutoo D (1979)**. Substance P: decrease in substancia nigra and globus pallidus in Huntington'chorea. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, 495-504, Raven Press, New York.

118. **Kanazawa I, Bird E, O'Connell R and Powell D (1977)**. Evidence for a decrease in substance P content of substancia nigra in Huntington's chorea. Brain Research, **120**, 387-392

119. **Kanasawa I, Kimura M, Murata M, Tanaka Y and Cho F (1990)**. Choreic movements in the macaque monkey induced by kainic acid lesions of the striatum combined with l-dopa. Brain, **113**, 509-535

120. **Kanazawa I, Sasaki H, Muramoto O, Matsushita M, Mizutani T, Iwabuchi K, Teruaki I and takahata N (1985)**. Studies on Neurotransmitter markers and striatal neuronal cell density in Huntington's disease and dentatorubropallidoluysian atrophy. Journal of Neurological Sciencess, **70**, 151-165

121. **Kaplan GP, Hartman BK nd Creveling CR (1979)**. Immunohistochemical demonstration of catecol-O-methyltransferase in mammalian brain. Brain Research, **167**, 241-250

122. **Kato T, Dong B, Ishii K and Kinemuchi H (1986).** Brain dialysis: in vivo metabolism of dopamine and serotonin by monoamine oxidase A but not B in the striatum of unrestrained rats. Journal of Neurochemistry. **46**, 1277-1282.

123. **Kelly E, Jenner P and Marsden CD (1987).** Comparison of changes in locomotor activity with striatal homovanillic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid concentrations following the bilateral intranigral injections of agonist drugs in rats. J. Pharm. Pharmacol, **39**, 196-202

124. **Kelly PH, Moore KE, Spokes EG and Bird ED (1979).** Cathecol-O-methyltransferase in the kainic-acid treated rat striatum and in the basal ganglia in the Huntington's disease. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, 625-632, Raven Press, New York.

125. **Kim SK, Toyoshima Y, Arai Y, Kinemichi, Tadano T, Oyama K, Satoh N and Kisara K (1991).** Inhibition of monoamine oxidase by two substrates analogues, with different references for 5-hydroxitriptamine. Neuropharmcology, **30**, 329-335

126. **Kish SJ, Snannak K and Hornykiewicz O (1987).** Elevated serotonin and reduced dopamine in subregionally divided Huntington's disease striatum. Annals of Neurology, **22**, 386-389

127. **Klawans HL (1970).** A pharmacological analysis of Huntington's Chorea. European Neurology, **4**, 148-163.

128. **Klawans HL (1971).** Cerebrospinal fluid homovanillic acid in Huntington's chorea. Journal of Neurological Sciencess, **13**, 277-279.

129. **Koe BK and Weissman A (1966).** p-Clorophenylalanine: A specific depletor of brain serotonin. J. Pharmacol. Exp. Ther., **154**, 499-516

130. **Koh JY, Peters S and Choi DW (1986).** Neurons containing NADPH-Diaphorase are selectively resistant to quinolinic toxicity. Science **234**, 73-76

131. **Koller WC and Trimble J (1985).** Gait abnormality of Huntington's disease. Neurology, **35**, 1450-1454

132. **Kopin IJ (1985).** Cathecolamines metabolism: basic aspects and clinical significance. Pharmacological Reviews, **37**, 333-364.

133. **Korf J, Aghajanian GK and Roth RH (1973).** Stimulation and destruction of the nucleus coeruleus: Opposite effects on 3-methoxy-4-hydroxiphenyl ethyleneglycol sulfate levels in rat cerebral cortex. European Journal of Pharmacology, **21**, 305-310.

134. **Kornhuber J and Kornhuber ME (1986).** Presynaptic dopaminergic modulation of cortical input to the striatum. Life Sci, **39**, 669-674

135. **Kurlan R, Caine E, Rubin A, Nemeroff CB, Bissette G, Zaczek R, Coyle J, Spielman FJ, Irvine C and Shoulson I (1988a).** Cerebrospinal fluid correlates of depression in Huntington's disease. Archives of Neurology, **45**, 881-883.

136. **Kurlan R, Goldblatt D, Zaczek R, Jeffries K, Irvine C, Coyle J and Shoulson I. (1988b).** Cerebrospinal Fluid Homovanillic Acid and Parkinsonism in Huntington's Disease. Annals of Neurology, **24**, 282-284.

137. **Kurtzke JF (1979).** Huntington's disease: mortality and morbility data from outside the United States. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, 13-26, Raven Press, New York.

138. **Kuwert T, Lange HW, Langen K-J, Herzog H, Aulich A and Feinendegen LE (1990).** Cortical and subcortical glucose consumption measured by PET in patients with Huntington's disease, Brain, **113**, 1405-1423

139. **Lange H, Thörner G, Hopf A and Schröder (1976).** Morphometric studies of neuropathological changes in choreatic diseases. Journal of Neurological Sciences, **28**, 401-425

140. **Laplane D, Levasseur M, Pillon B, Dubois, Baulac M, Mazoyer B, Tran-Dihn S, Sette G, Danze F and Baron JC (1989).** Obsessive-compulsive and other behavioural changes with bilateral basal ganglia lesions. Brain, **112**, 699-725

141. **Lasker AG, Zee DS, Hain TC, Folstein SE and Singer HS (1987).** Saccades in Huntington's Disease: Initiation defects and distrability. Neurology, **33**, 364-370

142. **Lenders KL, Frackowiak RSJ, Quinn N and Marsden CD (1986).** Brain energy metabolism and dopaminergic function in Huntington's disease measured in vivo using positron emmission tomography. Movement Disorders, **1**, 69-77

143. **LLoyd KG, Dreksler S and Bird ED (1977).** Alterations in ^{3}H-GABA binding in Huntington's chorea. Life Science, **21**, 747-754

144. **Maidment NT, Routledge C, Martin KF, Brazell MP and Marsden CA (1986).** Identification of neurotransmitter autoreceptors using measurement of release *in vivo*. In *"Monitoring Neurotransmitter Release During Behaviour.* Joseph MH, Fillenz M, MacDonald IA and Marsden CA editors., 120-132, Ellis Horwood, Chichester

145. **Mann JJ, Kaplan RD and Bird ED (1986).** Elevated post-mortem monoamine oxidase B activity in the caudate nucleus in Huntington's disease compared with schizophrenics and controls (1986). Journal of Neural Transmission, **65**, 277-283

146. **Martin GE (1986).** Cathecolamine release within the striatum of the freely moving rat. Annals of New York Academy of Science., **473**, 151-159

147. **Martin JB (1984).** Huntington's Disease: New appraoches to an old problem. Neurology, **34**, 1059-1072

148. **Martin JB and Gusella JF (1986).** Huntington's Disease: pathogenesis and management. The New England Journal of Medecine, **315**, 1267-1276

149. **May PC and Gray PN (1985).** The mechanism of glutamate-induced degeneration of cultured Huntington's disease and control fibroblasts. Journal of Neurological Sciencess, **70**, 101-112

150. **Mayeux R, Stern Y, Herman A, Greenbaum L and Fanh S (1986).** Correlates of early disability in Huntington's Disease. Annals of Neurology, **20**, 727-731

151. **Mayeux R, Stern Y, Sano M, Williams JBW and Cote LJ (1988).** The relationship of serotonin to depression in Parkinson's disease. Movement Disorders, **3**, 237-244

152. **Mazziotta JC, Phelps ME, Pahl JJ, Huang SC, Baxter LR, Riege WH, Hoffmann,JM, Kuhl DE, Lanto AB, Wapenski JA, et al 1987).** Reduced cerebral glucose metabolism in assyntomatic subjects at risk for Huntington's disease. New England Journal of Medecine, **316** (7), 357-362

153. **McEntee WJ and Crook TH (1990).** Age-associated memory impairment: a role for catecholamines. Neurology, **40**, 526-530

154. **McGeer, EG, McGeer PL, Hattori T and Vincent SR (1979).** Kainic acid neurotoxicity and Huntington's disease. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, 577-592, Raven Press, New York,

155. **McGeer, EG, Peters DAV and McGeer PL (1968).** Inibition of rat brain tryptophan hydroxilase by 6-halotryptophans. Life Science, **7**, 605-615

156. **Meek JL and Loftstrandh (1976).** Tryptophan hydroxilase in discrete brain neclei: comparision in activity *in vitro* and *in vivo*. European Journal of Pharmacology, **37**, 377-380

157. **Melamed E, Hefti F and Bird ED (1982).** Huntington chorea is not associated with hyperactyvity of nigrostriatal dopaminergic neurons: Studies in postmortem tissues and in rats with kainic acid lesions. Neurology, **32**, 640-644.

158. **Mendez MF, Adams NL and Lewandowsky KS (1989).** Neurobehavioral changes associated with caudate lesions, Neurology, **39**, 349-354

159. **Mignot E and Laude D (1985).** Study of dopamine turnover by monitoring the decline of dopamine metabolites in rat CSF after alfa-methyl-p-tyrosine. Journal of Neurochemistry. **45**, 1527-1533.

160. **Mignot E, Laude D and Elghozi (1984).** Kinetics of drug-induced changes in dopamine and serotonin metabolite concentrations in the CSF of the rat. Journal of Neurochemistry, **42**, 819-825

161. **Mindham RHS, Steele C, Folstein MF and Lucas J (1985).** A comparison of the frequecy of major affective disorder in Huntington's disease and Alzheimer's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **48**, 1172-1174

162. **Mitchell IJ, Brotchie JM, Sambrook MA and Crossmann AR (1991).** Modeliing the functional organization of the basal ganglia, A parallel distributrd processing appraoch. Movement Disorders, **3**, 189-204

163. **Mitchell IJ, Jackson A, Brown GDA and Crossmann AR (1989)** Role of sub-talamic nucleus in experimenta chorea. Evidence from 2-deoxiglucose metabolic mapping and horseradish peroxidase tracing studies. Brain, **112**, 1533- 1548

164. **Miwa S, Fujiwara M, Lee K and Fujiwara M (1987).** Determination of serotonin turnover in the rat brain using 6-fluorotriptophan. Journal of Neurochemistry, **48**, 1577-1580

165. **Mohr E, Fabbrini G, Willians J, Schlegel J, Cox C, Fedio P and Chase TN (1989).** Dopamine and memory function in Parkinson's disease. Movement Disorders, **4**, 113-120

166. **Moss MB, Albert MS, Butters N and Payne M (1986).** Differencial patterns of memory loss among patients with Alzheimer's disease, Huntington's disease, and alcoholic Korsakoff's syndrome. Arch. Neurol., **43**, 239-246

167. **Murphy GF, Robison D and Sharman DF (1969).** The effect of tropolone on the formation of 3,4-dihydroxyphenylacetic and the 4-hydroxy-3-methoxyphenylacetic acid in the brain of the mouse. Br. J. Pharmac., **36**, 107-115

168. **Myers RH, Sax DS, Schoenfield M, Bird ED, Wolf PA, Vonsattel JP, White RF and Martin JB (1985).** Late onset of Huntington's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **48**, 530-534

169. **Myers RH, Vonsattel JP, Stevens TJ, Cupples LA, Richardson EP, Martin JB and Bird ED (1988).** Clinical and neuropathological assessment of severety in Huntington's diseaase. Neurology, **38**, 341-347

170. **Nausieda PA (1986).** Sydenham's chorea, chorea gravidarum and contraceptive induced chorea. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken PJ, Bruyn GW and Klawans HL editors, **vol 49**, pp. 359-367, Elsevier Science Publishers

171. **Neckers LM and Meek JL (1976).** Measurement of 5-HT turnover rate in discrete nuclei of rat brain. Life Science, **19**, 1579-1584

172. **Nissbrandt H. and Carlsson A. (1987).** Turnover of dopamine and dopamine metabolites in the rat brain: Comparison between striatum and substantia nigra. Journal of Neurochemistry., **19**, 959-967

173. **Nissbrandt H., Engberg G., Wikström H., Magnusson T. and Carlson A. (1988).** NSD 1034: An amino acid decarboxylase inhibitor with a stimulatory action on dopamine synthesis not mediated by classical dopamine receptors. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology **338**,148-161.

174. **Nissbrandt H, Sundström E, Jonsson G, Hjorth S and Carlsson A (1989).** Synthesis and release of dopamine in rat brain: Comparison between substantia nigra pars compacta, pars reticulata, and striatum. Journal of Neurochemistry. **52**, 1170-1182.

175. **NG LKY, Gelhard RE, Chase TN and MacLean PD (1973).** Drug induced dyskinesia in Monkeys: a pharmacological model employing 6-hydroxydopamine. In *Advances in Neurology*, Barbeau A, Chase TN and Paulson GW editors, **vol 1**, 651-655, Raven Press, New York.

176. **Nguyen T.B. and Angers M. (1987).** Effects of different monoamine oxidase inhibitors on the metabolism of L-DOPA in the rat brain. Biochem. Pharmac. **36**, 1731-1735.

177. **Noronha ABC, Roos RP, Antel JP and Arnason BGW (1979).** Huntington's disease: abnormality of lymphocyte capping. Annals of Neurology, **6**, 447-450

178. **Noth J and Podoll K (1987).** Chorea /Tics: Clinical aspects and treatment. In *Motor disturbances I*, Benecke R, Conrad B and Marsden CD editors, pp 231-242, Academic Press

179. **Offori S, Breton C, Hof P and Schorderet M (1986).** Investigation of dopamine content, synthesis, and release in the rabbit retine in vitro: I. Effects of dopamine precursors, reserpine, amphetamine, and L-DOPA decarboxylase and monoamine oxidase inhibitors. Journal of Neurochemistry. **47**, 1199-1206.

180. **Oreland L, Arai Y and Stenstrom A (1983).** The effect of deprenyl (selegyline) on intra- and extraneuronal dopamine oxidation. Acta Neurologica Scandinavica Suppl. **95**, 81-85.

181. **Padberg GW and Bruyn GW (1986).** Chorea - differential diagnosis. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken PJ, Bruin GW and Klawans HL editors, **vol 49**, pp. 549-564, Elsevier Science Publishers, Amesterdam.

182. **Paxinos G. and Watson C. (1982).** The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.

183. **Pearson SJ and Reynolds GP (1989).** The neurochemical pathology of chorea in Huntington'disease. Journal of Neurochemistry, **52** (Suppl)., S208C.

184. **Pei Q, Zetterström T and Fillenz M (1989).** Both systemic and local administration of benzodiazepine agonists inhibit the *in vivo* release of 5-HT from the ventral hipocampus. Neuropharmacology, **28**, 1061-1066

185. **Penney JB and Young AB (1982).** Quantitative autoradiography of neurotransmitter receptors in Huntington'disease. Neurology **32**, 1391-1395

186. **Penney JB, Young AB, Shoulson I, Starosta-Rubinstein S, Snodgrass SR, Sanchez-Ramos J, Ramos-Arroyo M, Gomez F, Penchaszadeh H, Conneally M, Bonilla E and Wexler NS (1990).** Huntington's disease in Venezuela: 7 years of follow-up on symtomatic and assymptomatic individuals. Movement Disorders, **5**, 93-99

187. **Perry TL and Hansen S (1990).** What excitotoxine kills striatal neurons in Huntingtn's disease? Clues from neurochemical studies. Neurology **40**, 20-24

188. **Perry TL, Hansen S and Kloster M (1973).** Huntington's chorea: deficiency of gama-aminobutiric acid in brain. The New England Journal of Medicine **208**, 337-342

189. **Peters DAV (1971).** Inibition of serotonin biosynthesis by halotryptophans *in vivo*. Biochem.ical Pharmacology, **20**, 1413-1421

190. **Peyser CE and Folstein SE (1990).** Huntington's disease as a model for mood disorders. Clues from neuropathology and neurochemistry. Molecular and Chemical Neuropathology, **12**, 99-119

191. **Pillon B, Dubois B, Ploska A and Agig Y (1991).** Severety and specificity of cognitive impairment in Alzheimer's , Huntington's, and parkinson's diseases and progressive supranuclear palsy. Neurology, **41**, 634-643

192. **Poddol K, Caspary P, Lange HW and Noth J (1988).** Language functions in Huntington'disease Brain, **111**, 1475-1503

193. **Poeck K (1991).** Neuropsychology, dementia and aging. Current Opinion in Neurology and Neurosurgery, **4**, 77-79

194. **Powis DA (1983).** Cardiac glycosides and autonomic neurotransmission. Journal of Autononic Pharmacology. **3**, 127-154.

195. **Quinn N and Marsden CD (1984).** A double blind trial of sulpiride in Huntington's disease and tardive dyskinesia. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **47**, 844-847

196. **Racké K, Böhm E and Muscholl E (1987).** The role of cytoplasmatic (newly synthetised). dopamine for the spontaneous and electrically evoked release od dopamine and its metabolites from isolated neurointermidiate lobe of the rat pituitary gland in vitro. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **335**, 21-27

197. **Racké K and Muscholl E (1986).** Release of endogenous 3,4-dihydroxyphenylethylamine and its metabolites from the isolated neurointermediate lobe of the rat pituitary gland. Effects of electrical stimulation and of inhibition of monoamine oxidase and reuptake. Journal of Neurochemistry. **46**, 745-752.

198. **Raiteri M, Cerrito F, Cervoni AM and Levi G (1979).** Dopamine can be released by two mechanisms diferentially affected by the dopamine transport inhibitor nomifensine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic, **208**, 195-202.

199. **Reinhard JF and Wurtzman RJ (1977).** Relation between brain 5-HIAA and the release of serotonin into brain synapses. Life Science, **21** , 1741-1746

200. **Reynolds GP & Garrett NJ (1986).** Striatal dopamine and homovanillic acid in Huntington'd disease. Journal of Neural Transmission, **65**, 151-155

201. **Reynolds GP & Pearson SJ (1987).**Decreased glutamic acid and increased 5-idroxytryptamine in Huntington's disease brain. Neurosciences Letters, **78**, 233-238

202. **Riederer P, Konradi C, Schay V, Kienzl E, Birkmayer G, Danielczyk W, Sofic E,and Youdin MBH (1986).** Localization of MAO-A and MAO-B in humam brain: a step in understanding the therapeutic action of L-Deprenyl. In Advances in Neurology, **vol 45**, pp. 111-118, Raven Press, New York.

203. **Rivett AJ, Francis A and Roth JA (1983).** Distinct celular localization of membrane-bound and soluble forms of catechol-O-methyltransferase in brain. Journal of Neurochemistry, **40**, 215-219

204. **Roccatagliata G, Albano C, Cocito L and Maffini M (1979).** Interactions between central monoaminergic systems: dopamine-serotonin. Journal of Neurology, Neursurgery and Psychiatry, **42**, 1159-1162

205. **Roffler-Tarlov S, Sharman DF and Tegerdine P (1971).** 3,4-dihydroxypnenylacetic acid and 4-hydroxi-3-methoxyphenylacetic acid in the mouse striatum: a reflexion of intra- and extra-neuronal metabolism of dopamine? British Journal of Pharmacology, **42**, 343-351

206. **Roos RAC (1986).** Neuropathology of Huntington's chorea. In *Handbook of Clinical Neurology*, Vinken PJ, Bruyn GW and Klawans HL editors, **vol 49** (5), 315-326, Elsevier Science Publishers, Amesterdam.

207. **Roos RAC, Pruyt JFM, de Vries J and Bots GThAM (1985).** Neuronal distribuition in the putamen in Huntington's disease. Journal of Neurology, Neursurgery and Psychiatry, **48**, 422-425

208. **Roth RH, Murrin LC and Walters JR (1976).** Central dopaminergic neurons: effects of alterations in impulse flow on the accumulation of dihydroxyphenylacetic acid. European Journal of Pharmacology, **36**, 163-171.

209. **Saint-Cyr JA, Taylor AE and Lang AE (1988).** Procedural learning and neostriatal dysfunction in man. Brain, **111**, 941-959

210. **Salmon DP, Kwo-on-Yuen PF, Heindel WC, Butters and Thal LJ (1989).** Differentiation of Alzheimer'disease and Huntington'disease with dementia rating scale. Archives of Neurology, **46**,1204-1208

211. **Sanders-Busch E (1982).** Regulation of serotonin storage and release. In *Serotonin and biologica psychiatry*. Ho BT, Schoolar JC & Usdin E editors; Raven Press, New York, pp. 17-34

212. **Sarna GS, Huston PH , Tricklebank MD and Curzon G (1983).** Determinations of brain 5-hydroxytryptamine turnover in freely moving rats using repeated sampling of cerebrospinal fluid. Journal of Neurochemistry, **40**, 383-388

213. **Schoenberg BS (1979).** Epidemiologic approach to Huntington's disease. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, 1-12, Raven Press, New York.

214. **Schwarcz R, Köhler C, Fuxe K, Hökfelt T and Goldstein M (1979).** On the mechanism of selective neuronal degeneration in the Rat brain: Studies with ibitenic acid. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, vol 23, 655-668, Raven Press, New York.

215. **Scigliano G, Giovannini P, Girotti F, Grassi MP, Caraceni T and Schechter PJ (1984).** Gamma-vinyl GABA treatment of Huntington's disease. Neurology, **34**, 94-96

216. **Sershen H., Berger P., Jacobson A.E., Rice K.C. and Reith M.E. (1988).** Metaphit prevents locomotor activation induced by various psicostimulants and interferes with the dopaminergic system in mice. Neuropharmacology **27**, 23-30.

217. **Sharp T, Bramwell S.R. and Grahame-Smith D.G. (1989).** 5-HT_1 agonist reduce 5-hydroxytrytpamine release in rat hippocampus *in vivo* as determined by brain micro-dialysis. British Journal of Pharmacology, **96**, 283-290

218. Sharp T, Zetterström T and Ungerstedt U (1986). An *in vivo* study of dopamine release and metabolism in rat brain regions using intracerebral dialysis. Journal of Neurochemistry, **47**, 113-122.

219. Sheel-Krügger (1986). Dopamine-GABA interactions: evidence that GABA transmits, modulates and mediates dopaminergic functions in the basal gangliaand limbic system. Acta Neurololgica Scandinavica, **107(suppl)**, 73,9-41

220. Shoulson I (1981). Huntington's disease: functional capacities in patients treated with neuroleptic and antidepressant drugs. Neurology, **31**, 1333-1335

221. Shoulson I and Fanh S (1979). Huntington's Disease: clinical care and evaluation. Neurology, **29**, 1-3.

222. Shoulson I, Odoroff C, Oakes D, Behr J, Goldblatt D, Caine E, Kennedy J, Miller C, Bamford K, Rubin A, Plumb S and Kurlan R (1989). A controled clinical trial of baclofen as protective therapy in early Huntington's disease. Annals of Neurology **25**, 252-259

223. Shults C, Steardo L, Barone P, Mohr E, Juncos J, Serrati C, Tamminga CA and Chase TN (1986). Huntington's disease: Effect of cysteamine, a somatostatin-depleting agent. Neurology, **36**, 1099-1102

224. Smith AD and Bolam JP (1990). The neural network of the basal ganglia as revealed by the study of synaptic connections os identified neurones. Trends in Neurosciences, **13**, 259-265

225. Soares-da-Silva P (1987). Does brain 3,4-dihydroxiphenilacetic acid reflect dopamine release?. Journal of Pharmacy and Pharmcology, **39**, 127-129.

226. Soares-da-Silva P, Garrett MC and Moura D (1987). Assessment of brain dopaminergig brain activity in Huntington's chorea (HC) by simultaneous determination of CSF dopamine, DOPAC and HVA levels. Revista de Farmacologia Clinica y Experimental, 4, 240 (C-010)

227. Soares-da-Silva P. (1988a). Evidence for dopaminergic co-transmission in dog mesenteric arterial vessels. Br. J. Pharmacol. **95**, 218-224.

228. Soares-da-Silva P. (1988b). Dopamine and noradrenergic transmission. In: Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endothelium (Vanhoutte P.M., Ed.)., pp.187-195. Raven Press, New York.

229. **Sotrel A, Paskevich PA, Kiely DK, Bird ED, Williams RS and Myers RH (1991).** Morphometric analysis of the prefrontal cortex in Huntington's disease. Neurology, **41**, 1117-1123

230. **Spokes EGS (1979).** Doapime in Huntington's Disease - A study of post-mortem brain tissue. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, vol 23, 481-493, Raven Press, New York.

231. **Spokes EGS (1980).** Neurochemical Alterations in Huntington's Chorea - A study of post-mortem brain tissue. Brain, **103**, 179-210.

232. **Spokes EGS, Garrett NJ, and Iversen LL (1979).** Differencial effects of agonal status on measurements of GABA and Glutamate decarboxilase in human post-mortem brais tissue from controls and Huntington's chorea subjects. Journal of Neurochemistry **33**, 773-778

233. **Stahl SM, Thiemann S, Faull KF, Barchas JD and Berger PA (1986).** Neurochemistry of dopamine in Huntington's dementia and normal aging. Archives of General Psychiatry, **43**, 161-164.

234. **Starke K., Göthert M., Kilbinger H. (1989).** Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. Physiological Reviews, **69**, 864-989.

235. **Starkstein SE, Brant J, Folstein S, Strauss M, Berthier M, Pearlson GD, Wong D, McDonnell A and Folstein M (1988).** Neuropsychological and neuroradiological correlates in Huntington's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **51**, 1259-1263

236. **Stenstrom A, Arai Y, Oreland L (1985).** Intra- and extraneuronal monoamineoxidase-A and -B activities after central axotomy (hemisection). on rats. Journal of Neural Transmission, **61**, 105-113

237. **Sumbilla C & Lakowicz JR (1983).** Evidence for normal fibroblast cell membranes from individuals with Huntington's disease. Journal of Neurological Sciencess, **62**, 23-40

238. **Tecoma ES and Choi DW (1989).** GABAergic neocortical neurons are resistant to NMDA receptor-mediated injury. Neurology, **39**, 676-682

239. **Thompson PD, Berardelli A, Rothwell JC, Day BL, Dick JPR, Benecke R and Marsden CD (1988).** The coexistence of bradykynesia and chorea in Huntington's Disease and its implications for theories of basal ganglia control of movement. Brain, **111**, 223-244

240. **Toghi H, Abe T, Takahashi S, Ueno M and Nozaky Y (1990).** Cerebrospinal fluid dopamine, nrepinephrine and epineohrine concentrations in Parkinson's disease correlated with clinical symptoms. In *Advances in Neurology*, Steifler MB, Korczin AD, Melamed E and Youdim MBH editors, **vol 53**, 277-282, Raven Press, New York.

241. **Tolosa ES and Sparber SB (1974).** Apomorphine in Huntington's chorea: clinical obervations and theoretical considerations. Life Science, **15**, 1371-1380

242. **Traskman L, Asberg A, Bertilsson L and Sjostrand L (1981).** Monoamine metabolites in CSF and suicidal behavior. Archives of General Psichiatry, **38**, 631-636

243. **Trugman JM, James CL and Wooten GF (1991).** D_1/D_2 dopamine receptores stimulation by l-dopa. Brain, **114**, 1429-1440

244. **Urquhart N, Perry TL, Hansen S and Kennedy J (1975).** GABA content and Glutamic acid decarboxilase activity in brain of Huntington's chorea patients and control subjects. Journal of Neurochemistry **24**, 1071-1075

245. **Waldmeier P.C. (1987).** Amine oxidases and their endogenous subtrates (with special reference to monoamine oxidase and the brain). Journal of Neural Transmission, **Suppl.23**, 55-72.

246. **Waldmeier PC, Delini-Stula and Maitre L (1976).** Preferential deamination of dopamine by an A type monamine oxidase in rat brain. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. **292**, 9-14.

247. **Waldmeier PC, Lauder J, Blum W and Ritcher WJ (1981).** 3-Methoxytyramine: Its suitability as an indicator of synaptic dopamine release. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **315**, 219-225.

248. **Walker FO and Hunt VP (1989).** An open label trial of dextromethorphan in Huntington'disease. Clinical Neuropharmacology **12**, 322-330

249. **Walker FO, Young AB, Penney JB Dovorini-Zis K and Shoulson I (1984).** Benzodiazepine and GABA receptores in early Huntington's disease. Neurology, **34**, 1237-1240

250. **Wallesch C-W, and Fehrenbach RA (1988).** On the neurolinguistic nature of language abnormalities in Huntington's disease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **51**, 367-373

251. **Weinberger DR, Berman KF, Iadarola M, Driesen N and Zec RF (1988).** Prefrontal cortical blood flow and cognitive function in Huntington'sdisease. Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, **51**, 94-104

252. **Weiner WJ, Goetz C, Westheimer R and Klawans HL (1973).** Serotoninergic and antiserotoninergic influences on amphetamine-induced steriotyped behavior. Journal of Neurological Sciences., **20**, 373-379

253. **Wester P, Eriksson A, Forssell Å, Puu G and Adolfsson R (1988).** Monoamine metabolite concentrations and cholinesterase activities in cerebrospinal fluid of progressive dementia patients: relation to clinical parameters. Acta Neurologica Scandinavica, **77**, 12-21

254. **Westerink B.H.C., Bosker F.J. and Wirix E. (1984).** Formation and metabolism of dopamine in nine areas of the rat brain: modifications by haloperidol. Journal of Neurochemistry. 42:1321-1327.

255. **Westerink B.H.C., Damsma G. and de Vries J.B. (1989).** Effect of ouabain applied by intrastriatal microdialysis on the in vivo release of dopamine, acetylcholine, and amino acids in the brain of conscious rats. Journal of Neurochemistry. **52**, 705-712.

256. **Westerink BHC, Damsma G, De Vries JB and Koning H (1987).** Dopamine re-uptake inhibitors show inconsistent effects on the in vivo release of dopamine as measured by intracerebral dialysis in the rat. European Journal of Pharmacology, **135**, 123-128.

257. **Westerink BHC and Spaan SJ (1982).** Simultaneous determination of the formation rate of dopamine and its metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC). in various rat brain areas. Brain Research, **252**, 239-245.

258. **Westerink BHC & Van Putten FMS (1987).** Simultaneous determination of rates of synthesis and metabolism of dopamine in various areas of rat brain: Application to the effects of (+).-amphetamine. European Journal of Pharmacology. **133**, 103-110

259. **Wexler NS (1979).** Perceptual-motor, cognitive, and emotional characteristics of persons at risk for huntington's disease. In *Advances in Neurology*, Chase TN, Wexler NC and Barbeau A editors, **vol 23**, 257-272, Raven Press, New York,

260. **Whitehouse PJ, Trifiletti RR, Jones BE, Folstein SE, Price DL, Snyder SH and Kuhar MJ (1985).** Neurotransmitter receptor alterations in Huntington's disease: autoradiographic and homogenate studies with special reference to benzodiazepine recetor complexes. Annals of Neurology 18, 202-210

261. **Wolf WA, Youdim MBH and Kunh DM (1985).** Does brain 5-HIAA indicate serotonin release or monoamine oxidase activity? European Journal of Pharmacology, **109**, 381-387.

262. **Wong PT-H, McGeer PL, Rossor M and McGeer EG (1982).** Ornithine aminotranferase in Huntington's disease. Brain Research **231**, 466-471

263. **Wood PL and Altar CA (1988).** Dopamine release in vivo from nigrostriatal, mesolimbic, and mesocortical neurons: utility of 3-methoxytyramine measurements. Pharmacological Reviews, **40**, 163-187.

264. **Young AB, Greenamyre JT, Hollingsworth Z, Albin R, D'Amato C, Shoulson I and Penney JB (1988).** NMDA receptores losses in the putamen from patients with Huntington's disease. Science **241**, 981-983

265. **Young AB, Penney JB, Starosta-Rubinstein S, Markel DS, Berent S, Giordani B, Ehrenkaufer R, Jewett D and Hichwa R (1986).** PET scan investigations of Huntington' disease: cerebral metabolic correlates of neurological feature and functional decline. Annals of Neurology, **20**, 296-303

266. **Young AB, Shoulson I, Penney JB, Starosta-Rubinstein S, Gomez F, Travers H, Ramos-Arroyo MA, Snodgrass SR, Bonilla E, Moreno H and Wexler NS (1986).** Huntington'disease in Venezuela: Neurological feature and functional decline. Neurology, **36**, 244-249

267. **Zetterström T, Sharp T, Collin AK and Ungerstedt U (1988).** In vivo measurements of extracelular dopamine and DOPAC in the rat striatum after various dopamine-releasing drugs; implications for the origin of the extracelular DOPAC. European Journal of Pharmacology, **148**, 327-334.

268. **Zetterström T, Sharp T and Ungerstedt U (1984).** Effect of neuroleptic drugs on striatal dopamine release and metabolism in the awake rat studied by intracerebral dialysis. European Journal of Pharmacology, **106**, 27-37.

269. **Zetterström T., Sharp T. and Ungerstedt U. (1986).** Further evaluation of the mechanism by which amphetamine reduces striatal dopamine metabolism: a brain dialysis study. European Journal of Pharmacology **132**, 1-9.

ÍNDICE

	Pág.
I - INTRODUÇÃO GERAL	1
II - CAPÍTULO 1	17
Introducão	19
Material e métodos	23
1ªsérie experimental	27
Material e métodos	29
Resultados	33
Discussão	41
2ªsérie experimental	49
Material e métodos	50
Resultados	51
Discussão	55
3ªsérie experimental	61
Material e métodos	62
Resultados	62
Discussão	65
4ªsérie experimental	69
Material e métodos	72
Resultados	73
Discussão	79
Resumo e conclusões	85
Resumo	85
Conclusões finais	95
III - CAPÍTULO 2	97
Introdução	99
Material e Métodos	104
Resultados	110
Discussão	127
IV - DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES GERAIS	141
Discussão Geral	141
Conclusões Gerais	162
V - RESUMO, SUMMARY, RESUMÉ	165
Resumo	167
Summary	175
Resumé	183
VI - APÊNDICE	191
Resumos das història clínicas	193
Escala de Incapacidade Funcional	203
"Mini Mental State Examination"	204
Exame Neurológico Quantitativo	205
VII- BIBLIOGRAFIA	209