UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO

Keila Dayane Bariotto dos Santos

Investigação do mecanismo de ação do Nitroprussiato de Sódio em modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA.

Ribeirão Preto
2019

Keila Dayane Bariotto dos Santos

**Investigação do mecanismo de ação do Nitroprussiato de Sódio em
modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA.**

Tese apresentada ao Departamento de
Neurociências e Ciências do
Comportamento como requisito parcial
para a obtenção do título de Doutor (a)
em Ciências.

Área de concentração: Neurociências
Orientadora: Profa. Dra. Elaine Del Bel
Co-orientadora: Dra. Mariza Bortolanza

**Ribeirão Preto
2019**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Bariotto-dos-Santos, Keila Dayane

Investigação do mecanismo de ação do Nitroprussiato de Sódio em modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA.

Ribeirão Preto, 2019.

180 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Neurociências.

Orientador (a): Del Bel, Elaine.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bariotto-dos-Santos, Keila Dayane. **Investigação do mecanismo de ação do Nitroprussiato de Sódio em modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA.**

Tese apresentada ao Departamento de Neurociências e Ciências do Comportamento como requisito parcial para obtenção do título de Doutor (a) em Ciências

Aprovada em: _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____.

Prof. Dr. _____

Instituição:

Assinatura: _____.

Prof. Dr. _____

Instituição:

Assinatura: _____.

Prof. Dr. _____

Instituição:

Assinatura: _____.

Nada pode nos separar do amor de Deus, nem
a morte, nem a perseguição, nem a angústia,
nem o presente, nem o futuro.

Romanos 8:38-39

Ao meu pai Ivair: meu amigo e porto seguro, meu exemplo de força e luta.
À minha mãe Roselêa: minha amiga. Pelo seu amor por mim.

Às minhas avós Waldecy e Joana (in memorian),
meus dois grandes exemplos de vida, integridade e fé!

Aos animais utilizados na pesquisa, meu amor e respeito.

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos amigos: pela amizade sincera, pelo cuidado e carinho diário, pelo apoio, pelas discussões sobre o trabalho, pelo auxílio que parecia cair do céu, seja na hora de levar as caixas dos animais ao Biotério quanto na hora de realizar os experimentos. Pelos abraços que sempre me confortaram e transmitiram segurança. Eu pude contar com vocês em TODOS os momentos. Sou uma pessoa de sorte! Pelos churrascos, pelas reuniões prazerosas e divertidas na casa de cada um, pelas risadas. Pelos Congressos que participamos juntos... Se fosse para reencontrar vocês, valeriam a pena outros seis anos. Vocês foram/são luz em dias escuros, extraíram o melhor de mim. Amigos para toda a vida: sem vocês eu não teria chegado até aqui!

À professora Elaine: pela orientação durante o doutorado, pelas oportunidades. Obrigada por ter aberto as portas do laboratório a mim.

À minha querida amiga Célia e Sr. José: a senhora é para mim tudo isso que escrevi em cima. Sem a senhora tudo teria sido mais difícil. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio técnico e emocional rsrs. Obrigada por abrir as portas da sua casa e permitir tornar-me parte da sua família.

Ao meu querido amigo Maurício: você tem o dom de resgatar o melhor de mim! Poucos minutos ao seu lado e tudo fica colorido. Pelo carinho, proteção, cuidado e amor. Você ocupa um lugar especial no meu coração.

À minha querida amiga Carol: quando tudo parece sombra, ela tem o dom de me iluminar! Pelas aulas de farmacologia quando eu ainda nem tinha começado o mestrado. Obrigada por ter me ensinado sempre com tanto carinho e amor. Hoje, obrigada pela amizade sincera, pelos conselhos e permitir tornar-me parte da sua família, que eu amo.

Aos “antigos” amigos que eu conheci quando cheguei no laboratório, em 2012. Hoje não estão mais presentes, mas nossa amizade continua viva.

Aos amigos que passaram pelo laboratório durante um estágio e que ainda mantemos contato: Luciana, Samantha: Deus me concedeu a graça de conhecê-las.

À querida Luci (secretária do Departamento de Neurologia): pela paciência, atenção, disponibilidade e pelo auxílio durante o doutorado.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Básica e Oral.

Aos funcionários do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Ao CNPQ pelo suporte financeiro.

RESUMO

Bariotto-dos-Santos, K. **Investigação do mecanismo de ação do Nitroprussiato de Sódio em modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA**. 2019. 180 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O uso prolongado de L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina), utilizada para o tratamento dos sintomas motores da doença de Parkinson, resulta em complicações motoras debilitantes como a discinesia induzida por L-DOPA (LID). A modulação do sistema nitrérgico tem sido uma importante estratégia terapêutica dentre os estudos que buscam tratamentos farmacológicos para a LID. Resultados do grupo mostraram que a administração do 7-nitroindazol (7-NI), inibidor preferencial da isoforma neuronal da enzima sintase de óxido nítrico (NOS), reduz a LID em modelos experimentais. Esse efeito é associado à redução de marcadores moleculares clássicos da discinesia no estriado lesionado, como o gene de resposta imediata Δ FOS-B, e de fatores inflamatórios, como células positivas para a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), micróglia marcada com OX-42 e astrócitos marcados com GFAP. Interessantemente, doadores de óxido nítrico (NO), também produzem efeito antidiscinético. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na diminuição da discinesia pelos doadores de NO ainda não estão elucidados. Esse estudo teve como objetivo investigar os mecanismos pelo qual o doador de NO, Nitroprussiato de Sódio (NPS) atua na redução da LID. Foi realizada uma curva dose-resposta para a L-DOPA (10, 20, 30 e 50 mg/kg, gavagem) em ratos hemiparkinsonianos com o objetivo de caracterizar a discinesia, e então avaliamos o efeito do tratamento agudo (após a discinesia estabelecida) e crônico (durante o desenvolvimento da discinesia) com o NPS nas doses de 2 e 4 mg/kg (i.p.). Ao final dos experimentos, analisamos o número de núcleos positivos para Δ FOS-B, células positivas para COX-2, a densidade óptica integrada de OX-42 e GFAP, e as concentrações teciduais de nitrito, dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc e da forma fosforilada da proteína CREB no estriado dorsolateral lesionado de ratos. Por fim, avaliamos o efeito da aplicação intraestriatal de zaprinaste, inibidor das fosfodiesterases 5, 6 e 9 (aumentando os níveis de GMPc) sobre a LID. Nossos resultados demonstraram que o tratamento agudo ou crônico com NPS reduz a discinesia já estabelecida ou atenua o seu surgimento; entretanto, a modulação do NPS sobre a expressão de fatores moleculares, como Δ FOS-B, ou de fatores inflamatórios, como COX-2, OX-42 e GFAP não apresentou um padrão típico de drogas antidiscinéticas. O tratamento com NPS aumentou as concentrações teciduais de nitrito e GMPc (já previamente aumentados pelo tratamento com L-DOPA), ao passo que o tratamento com 7-NI 30 mg/kg preveniu esse aumento induzido pela L-DOPA. Surpreendentemente, o NPS teve ação inibitória sobre os níveis de AMPc e da proteína CREB fosforilada, de forma similar ao 7-NI. Por fim, o aumento dos níveis intracelulares de GMPc, através do zaprinaste (aplicado centralmente) reduziu a LID, confirmando a importância deste segundo mensageiro no controle da manifestação da LID. Desta forma, nossos resultados sugerem que a redução dos níveis de AMPc no estriado lesionado é um importante fator comum às drogas nitrérgicas, NPS e 7-NI na redução da discinesia em ratos hemiparkinsonianos, e essa modulação pode depender da mobilização da via NO/guanilato ciclase/GMPc no estriado.

Palavras-chave: doença de Parkinson, discinesia induzida por L-DOPA, Nitroprussiato de Sódio, 7-nitroindazol.

ABSTRACT

Bariotto-dos-Santos, K. **Investigation of the mechanism of action of Sodium Nitroprusside in animal model of L-DOPA-induced dyskinesia.** 2019. 180 p. Thesis (Ph. D. in Science) - Medicine School of Ribeirão Preto, São Paulo University, São Paulo, 2019.

The prolonged use of L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine), used to treat motor symptoms of Parkinson's disease, results in debilitating motor complications such as L-DOPA-induced dyskinesia (LID). Modulation of the nitrenergic system has been an important therapeutic strategy among studies seeking pharmacological treatments for LID. Previous results showed that the administration of 7-nitroindazole (7-NI), the preferential inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (NOS) isoform, reduces LID in experimental models. This effect is associated with the reduction of LID classical markers in the lesioned striatum, such as the immediate early gene Δ FOS-B, and of inflammatory factors such as cyclooxygenase-2 (COX-2)-positive cells, OX-42-labeled microglia and GFAP-labeled astrocytes. Interestingly, drugs with the opposite pharmacological profile, such as nitric oxide (NO) donors, also produce an anti-dyskinetic effect. However, the molecular mechanisms responsible for LID reduction by these donors are not yet elucidated. This study aimed to investigate the mechanisms by which the NO donor, Sodium Nitroprusside (SNP) acts to reduce LID. To this end, we performed a dose-response curve of L-DOPA (10, 20, 30 and 50 mg / kg, gavage) in hemiparkinsonian rats to characterize LID, and then evaluated the effect of acute (after established dyskinesia) or chronic treatment (during dyskinesia development) with SNP at doses of 2 and 4 mg/kg (i.p.). At the end of the experiments, we analyzed the number of Δ FOS-B and COX-2 positive cells, the integrated optical density of OX-42 and GFAP, and tissue concentrations of nitrite, cyclic nucleotides cAMP and cGMP and phosphorylated form of CREB protein in the lesioned dorsolateral striatum. Finally, we evaluated the effect of intraestriatal application of phosphodiesterases 5, 6 and 9 inhibitor zaprinaste on LID. Our results demonstrate that acute or chronic treatment with SNP attenuates the onset of LID, but the molecular factors such as Δ FOS-B, or inflammatory factors such as COX-2, OX-42 and GFAP did not present a standard pattern for LID reduction. SNP treatment increased nitrite and cGMP tissue concentrations, while 7-NI 30 mg/kg treatment prevented this increase induced by L-DOPA. Surprisingly, SNP significantly reduced cAMP levels and phosphorylated CREB protein levels, similar to 7-NI. Finally, the increased intracellular levels of cGMP through zaprinaste reduced LID, indicating the importance of cyclic nucleotides to LID control. Our results suggest that the reduction of cAMP levels in the lesioned striatum is an important factor common to NPS and 7-NI drugs to manifest their anti-dyskinetic action in hemiparkinsonian rats, and this modulation may depend on the modulation of the NO /soluble guanylate cyclase/cGMP pathway in the striatum.

Keywords: Parkinson's disease, L-DOPA-induced dyskinesia, Sodium Nitroprusside, 7-nitroindazole.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: FIGURA ESQUEMÁTICA ILUSTRANDO CADA NÚCLEO DOS NÚCLEOS DA BASE NO ENCÉFALO DE HUMANOS.	3
FIGURA 2: FIGURA ESQUEMÁTICA ILUSTRANDO CADA NÚCLEO E O NÚMERO TOTAL UNILATERAL DE NEURÔNIOS DENTRO DE CADA NÚCLEO DOS NÚCLEOS DA BASE DO ENCÉFALO DE RATO.	3
FIGURA 3: FIGURA ESQUEMÁTICA ILUSTRANDO O CLÁSSICO FUNCIONAMENTO DOS NÚCLEOS DA BASE.	6
FIGURA 4: FIGURA ESQUEMÁTICA DOS EVENTOS ENVOLVIDOS NA SÍNTESE E RECAPTAÇÃO DE DOPAMINA (DA).	13
FIGURA 5: FIGURA ESQUEMÁTICA ILUSTRANDO A ESTRUTURA E ATIVIDADE DA ISOFORMA NEURONAL DA ENZIMA NOS.	18
FIGURA 6: FIGURA ESQUEMÁTICA ILUSTRANDO A SÍNTESE E VIAS DE SINALIZAÇÃO DO NO.	19
FIGURA 7: FIGURA ESQUEMÁTICA MOSTRANDO OS BREGMAS SELECIONADOS PARA QUANTIFICAÇÃO DAS FIBRAS DOPAMINÉRGICAS JUNTAMENTE COM OS QUADRANTES.	39
FIGURA 8: DESENHO EXPERIMENTAL ADOTADO NO EXPERIMENTO 1.	44
FIGURA 9: DESENHO EXPERIMENTAL ADOTADO NO EXPERIMENTO 2.1.	45
FIGURA 10: DESENHO EXPERIMENTAL ADOTADO NO EXPERIMENTO 2.2.	47
FIGURA 11: DESENHO EXPERIMENTAL ADOTADO NOS EXPERIMENTOS 3.1 E 3.2.	49
FIGURA 12: DESENHO EXPERIMENTAL ADOTADO NO EXPERIMENTO 4.	50
FIGURA 13: EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE L-DOPA SOBRE A INDUÇÃO DOS MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS ANORMAIS EM RATOS LESIONADOS COM A 6-OHDA. (A).....	53
FIGURA 14: DENSIDADE ÓTICA INTEGRADA DE FIBRAS TH POSITIVAS EM SECÇÕES ROSTRAIS, MEDIAIS E CAUDAIS DE ANIMAIS QUE DESENVOLVERAM DISCINESIA EM RESPOSTA A DIFERENTES DOSES DE L-DOPA.	55
FIGURA 15: FOTOMICROGRAFIA DE SECÇÕES ROSTRAIS, MEDIAIS E CAUDAIS DE ANIMAIS QUE DESENVOLVERAM DISCINESIA EM RESPOSTA A DIFERENTES DOSES DE L-DOPA.	56
FIGURA 16: MÉDIA DE USO DO MEMBRO ANTERIOR CONTRALATERAL EM RELAÇÃO AO MEMBRO ANTERIOR IPSILATERAL À LESÃO COM 6-OHDA.	57
FIGURA 17: EFEITO DA MICROINJEÇÃO DE 6-OHDA NO FPM SOBRE AS CÉLULAS TH POSITIVAS DA SUBSTÂNCIA NEGRA E SUAS FIBRAS NO ESTRIADO.	58
FIGURA 18: EFEITO DA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO (2 MG/KG, I.P.) SOBRE A DISCINESIA JÁ ESTABELECIDDA PELA L-DOPA.	60
FIGURA 19: EFEITO DA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE A DISCINESIA JÁ ESTABELECIDDA PELA L-DOPA.	61
FIGURA 20: EFEITO DA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE O NÚMERO DE NÚCLEOS ΔFOS-B POSITIVOS.	63
FIGURA 21: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DE NÚCLEOS ΔFOS-B NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	63

FIGURA 22: EFEITO DA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS COX-2 POSITIVAS.	65
FIGURA 23: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DE CÉLULAS COX-2 NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	65
FIGURA 24: EFEITO DA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO 4 MG/KG SOBRE A DENSIDADE DA MICRÓGLIA MARCADA COM OX-42.	67
FIGURA 25: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DA MICRÓGLIA NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	67
FIGURA 26: EFEITO DA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO 4 MG/KG SOBRE A DENSIDADE DE ASTRÓCITOS MARCADOS COM GFAP.	69
FIGURA 27: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DE ASTRÓCITOS NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	69
FIGURA 28: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (2 MG/KG, I.P.) SOBRE A O DESENVOLVIMENTO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA.	72
FIGURA 29: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA.	75
FIGURA 30: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE O NÚMERO DE NÚCLEOS ΔFOS-B POSITIVOS.	77
FIGURA 31: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DE NÚCLEOS ΔFOS-B POSITIVOS NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	77
FIGURA 32: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS COX-2 POSITIVAS.	79
FIGURA 33: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DAS CÉLULAS COX-2 POSITIVAS NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	79
FIGURA 34: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE A EXPRESSÃO DA MICRÓGLIA NO ESTRIADO IPSILATERAL À LESÃO.	80
FIGURA 35: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DA MICRÓGLIA NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO.	81
FIGURA 36: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE A EXPRESSÃO DE ASTRÓCITOS NO ESTRIADO IPSILATERAL À LESÃO.	82
FIGURA 37: FOTOMICROGRAFIAS REPRESENTATIVAS DA EXPRESSÃO DE ASTRÓCITOS NO ESTRIADO DORSOLATERAL, IPSILATERAL À LESÃO DE RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM L-DOPA (A, A', A'') E RATOS TRATADOS CRONICAMENTE COM NPS4/L-DOPA (B, B', B'').	82
FIGURA 38: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) E/OU 7-NITROINDAZOL (30 MG/KG, I.P.) SOBRE AS CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS DE NITRITO NO ESTRIADO DORSOLATERAL IPSILATERAL À LESÃO DE RATOS HEMI-PARKINSONIANOS.	84
FIGURA 39: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM 7-NITROINDAZOL (30 MG/KG, I.P.) E/OU NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE OS NÍVEIS	

DE AMPC E GMPC NO ESTRIADO DORSOLATERAL IPSILATERAL À LESÃO DE RATOS HEMI-PARKINSONIANOS.	88
FIGURA 40: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM 7-NITROINDAZOL (30 MG/KG, I.P.) OU NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 MG/KG, I.P.) SOBRE A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PCREB NO ESTRIADO DORSOLATERAL IPSILATERAL À LESÃO DE RATOS HEMI-PARKINSONIANOS.	89
FIGURA 41: EFEITO DO AUMENTO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE GMPC NO ESTRIADO DORSAL IPSILATERAL À LESÃO DE ANIMAIS DISCINÉTICOS.	91
FIGURA 42: EFEITO DO AUMENTO E/OU DIMINUIÇÃO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE GMPC NO VENTRÍCULO LATERAL E/OU ESTRIADO DORSAL IPSILATERAL À LESÃO DE ANIMAIS DISCINÉTICOS.	123
FIGURA 43: EFEITO DO AUMENTO DOS NÍVEIS INTRACELULARES DE GMPC NO ESTRIADO DORSAL IPSILATERAL À LESÃO DE ANIMAIS DISCINÉTICOS.	125
FIGURA 44: FOTOMICROGRAFIAS MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DE CÂNULA NO VENTRÍCULO LATERAL E NO ESTRIADO DORSAL IPSILATERAL À LESÃO.	126

MATERIAL SUPLEMENTAR

A importância da sinalização nitrérgica estriatal na manifestação da discinesia induzida por L-DOPA..... 120

A aplicação intraestriatal ou intracerebroventricular de inibidor da fosfodiesterase 9 (BAY736691) não modifica a discinesia induzida por L-DOPA..... 121

O aumento dos níveis intracelulares de GMPc através da aplicação intraestriatal de inibidor da fosfodiesterase 5 (Vardenafil) e/ou através do análogo do GMPc (8-bromo-GMP) não modifica a discinesia induzida por L-DOPA.

. 121

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IX
RESUMO	X
ABSTRACT	XI
LISTA DE FIGURAS	XIII
INTRODUÇÃO.....	1
OS NÚCLEOS DA BASE	2
SISTEMA DOPAMINÉRGICO.....	9
A DOENÇA DE PARKINSON (HISTÓRICO).....	9
FISIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON	10
DOENÇA DE PARKINSON: TERAPÊUTICA COM L-DOPA.....	11
PARTICIPAÇÃO DE OUTROS SISTEMAS NO MECANISMO MOLECULAR DA DISCINESIA.....	16
VIA DE SINALIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO	16
PROCESSOS INFLAMATÓRIOS	23
OBJETIVOS	26
OBJETIVO GERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
MATERIAL E MÉTODOS	29
ANIMAIS.....	30
DROGAS	30
CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E LESÃO UNILATERAL DA VIA NIGRO-ESTRIATAL ..	31
ANÁLISE DO COMPORTAMENTO	32
TRATAMENTO COM L-DOPA E ANÁLISE DOS MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS ANORMAIS.....	33
ANÁLISE HISTOLÓGICA	35
ANÁLISE DE IMAGENS	38
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
DESENHO EXPERIMENTAL	42
DETERMINAÇÃO DA DOSE DE L-DOPA E APLICAÇÃO SISTÊMICA DE MODULADORES DOPAMINÉRGICOS.....	43
Experimento 1 – Desafio a diferentes doses de L-DOPA:	43
Experimento 2.1 – Aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 2 e 4 mg/kg, i.p. sobre a discinesia já estabelecida por L-DOPA:.....	44
Experimento 2.2 – Tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio 2 e 4 mg/kg, i.p. sobre o desenvolvimento da discinesia	45

Experimento 3.1 – Determinação dos níveis dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão após tratamento de animais parkinsonianos com Nitroprussiato de Sódio 4mg/kg e/ou 7-Nitroindazol 30 mg/kg.....	47
Experimento 3.2 – Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg e 7-Nitroindazol 30 mg/kg crônico: Determinação das concentrações teciduais de nitrito e expressão da proteína pCREB	47
Experimento 4 – Aplicação intraestriatal de zaprinaste, droga que inibe as fosfodiesterases 5, 6 e 9	49
RESULTADOS	51
1) A intensidade da discinesia induzida por L-DOPA é dependente da lesão dos neurônios dopaminérgicos produzida pela 6-OHDA	52
2) A acinesia observada no teste de caminhada está associada à perda robusta das fibras dopaminérgicas no estriado de ratos lesionados com a 6-OHDA, comprovada pela imunohistoquímica para a enzima TH	56
3) A aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 2 e 4 mg/kg reduziu a discinesia já estabelecida pela L-DOPA.....	58
4) Os marcadores moleculares associados à discinesia não refletem de forma significativa a diminuição dos movimentos involuntários anormais causada pela aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg	62
5) O tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (2 e 4 mg/kg) reduz o desenvolvimento e expressão da discinesia induzida por L-DOPA	70
6) Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg sobre os marcadores moleculares associados a discinesia: ΔFOS-B, COX-2, OX-42 e GFAP no estriado ipsilateral à lesão	76
7) Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de sódio (4 mg/kg) e/ou 7-Nitroindazol (30 mg/kg) sobre os níveis de nitrito na porção dorsolateral do estriado ipsilateral à lesão:	83
8) O tratamento crônico com Nitroprussiato de sódio (4 mg/kg) e/ou 7-Nitroindazol (30 mg/kg) impediu o aumento dos níveis do nucleotídeo AMPc na porção dorsolateral do estriado ipsilateral à lesão:	85
9) O tratamento crônico com Nitroprussiato de sódio (4 mg/kg) e/ou 7-Nitroindazol (30 mg/kg) atenuou a expressão da proteína pCREB na porção dorsolateral do estriado ipsilateral à lesão:	88
10) A aplicação intraestriatal de zaprinaste, droga que inibe as fosfodiesterases 5, 6 e 9 reduz a discinesia induzida por L-DOPA.....	90
DISCUSSÃO	92
O desenvolvimento e expressão da discinesia induzida por L-DOPA é dependente, ao menos em parte, da extensão da lesão produzida pela 6-OHDA.....	94
A aplicação aguda e/ou crônica de NPS2 e 4 mg/kg reduziu a discinesia já estabelecida e/ou atenuou o surgimento da discinesia induzida pela L-DOPA.....	97
Mecanismo de ação do doador de NO sobre a discinesia induzida por L-DOPA: análises moleculares.....	101
Mecanismos inflamatórios envolvidos na discinesia induzida por L-DOPA:	103
Mecanismo de ação do doador de NO sobre a discinesia induzida por L-DOPA: análise de segundos mensageiros e metabólitos do NO.	108
Deficiências do trabalho aqui apresentado.....	115
CONCLUSÃO.....	117

MATERIAL SUPLEMENTAR.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127

INTRODUÇÃO

OS NÚCLEOS DA BASE

Divisão anatômica. Os núcleos da base são um grupo de núcleos subcorticais envolvidos em uma variedade de processos que incluem aprendizagem motora, formação de hábitos, seleção de movimentos desejáveis, entre outros (Cisek e Kalaska, 2010; Graybiel *et al.*, 1994; Hirosaka *et al.*, 2000; Mink, 1996; Redgrave *et al.*, 1999; Wichmann e DeLong, 2003; Yin e Knowlton, 2006). Os núcleos da base podem ser subdivididos em aspectos “dorsal” e “ventral”. O aspecto dorsal dos núcleos da base em roedores consiste de quatro maiores núcleos (Grillner *et al.*, 2013; Tepper *et al.*, 2007): o estriado, o globo pálido, o núcleo subtalâmico (NST) e a substância negra (SN). Em roedores, o estriado é um único núcleo; em primatas, é composto pelos núcleos caudado e o putamen, que são separados pela cápsula interna. O globo pálido consiste dos segmentos externo (GPe) e interno (GPi). Em roedores, o segmento interno é equivalente ao núcleo entopeduncular. A SN é dividida em duas partes funcionalmente distintas. A parte reticulada (SNr) e a parte compacta (SNc) compartilham aferentes similares mas apresentam distintas eferências. A SNr envia projeções ao tálamo, colículo superior e núcleo pedunculopontino, enquanto a SNc consiste principalmente de neurônios dopaminérgicos que inervam principalmente o estriado. A SNr e o GPi são as principais estruturas de saída dos núcleos da base. As distinções entre esses dois núcleos são devido às partes do corpo que eles estão relacionados. A SNr está envolvida em movimentos dos olhos, cabeça e pescoço, enquanto que o GPi está envolvido em movimentos do tronco e membros (Gerfen e Bolam, 2017). A divisão ventral dos núcleos da base consiste do núcleo acumbens, o pálido ventral e a parte medial do NST e SN. A parte dorsal dos núcleos da base é principalmente envolvida com funções motoras e associativas, enquanto a parte ventral é principalmente envolvida com funções límbicas ou emocionais (Gerfen e Bolam, 2017- **figura 1 e 2**).

Figura 1: Figura esquemática ilustrando cada núcleo dos núcleos da base no encéfalo de humanos em secção sagital (retirado de <http://sehati.org/index/patientresources/normalanatomy>).

Figura 2: Figura esquemática ilustrando cada núcleo e o número total unilateral de neurônios dentro de cada núcleo dos núcleos da base do encéfalo de rato em secção sagital. Vias excitatórias estão mostradas em verde e inibitórias em vermelho. (Estriado = correspondente ao núcleo caudado e putâmen em primatas); GPe = segmento externo do globo pálido); (EP = núcleo entopeduncular, equivale ao segmento interno do globo pálido em primatas); (NST = núcleo subtalâmico); (SNc = substância negra compacta); (SNr = substância negra reticulada). Adaptado de Oorschot, 1996.

O estriado é a principal estrutura dos núcleos da base e a maioria das células estriatais são neurônios de projeção espinhosos cuja atividade é determinada por

aferências excitatórias do córtex cerebral e tálamo. Consequentemente, a informação que os neurônios de projeção espinhosos transmitem dentro do circuito dos núcleos da base é determinada pelas aferências corticoestriatais e tálamoestriatais. A maior parte das aferências que chegam ao estriado é fornecida por neurônios corticoestriatais e piramidais, utilizam o glutamato como neurotransmissor e estão localizados, principalmente, na camada cinco do córtex (Gerfen e Bolam, 2017).

As aferências corticais ao estriado possuem como alvo principal os neurônios de projeção espinhosos (Somogyi *et al.*, 1981), que constituem 95% da população de células estriatais (Kemp e Powel, 1971). Dessa forma, os neurônios de projeção espinhosos constituem o principal alvo de entrada e saída de informação do estriado. Menos numerosos e desprovidos de espinhas, os interneurônios (Bishop *et al.*, 1982; DiFiglia *et al.*, 1976), não projetam seus axônios para fora do estriado, mas distribuem seus axônios dentro do estriado e fazem contato sináptico com os neurônios de projeção (Gerfen e Bolam, 2017). Os interneurônios constituem uma variedade de subtipos que podem ser definidos com base em diferentes peptídeos e neurotransmissores que eles contêm: 1) interneurônios colinérgicos gigantes (Bolam *et al.*, 1984; Kawaguchi e Kubota, 1993); 2) interneurônios que utilizam GABA como o principal neurotransmissor (Bolam *et al.*, 1983; Oertel e Mugnaini, 1984; Pasik *et al.*, 1988; Ribak *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1987). Outras classes de interneurônios são caracterizadas pelo padrão de coexpressão de neuropeptídeos. O tipo mais abundante são interneurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina (Cowan *et al.*, 1990; Gerfen *et al.*, 1985; Kita *et al.*, 1990; Kubota e Kawaguchi, 1993). A segunda maior classe de interneurônios GABAérgicos coexpressam somatostatina, neuropeptídeo Y e/ou a enzima óxido nítrico sintase (Chesselet e Robins, 1989; Dawson *et al.*, 1991; Pasik *et al.*, 1988; Smith e Parent, 1986; Vincent *et al.*, 1983a, b).

As duas vias de saída do estriado, a via direta e indireta, são formadas por projeções dos axônios de dois subtipos de neurônios de projeção espinhosos (Kawaguchi *et al.*, 1990) e expressam os subtipos D1 e D2 dos receptores de dopamina, respectivamente.

Estudos utilizando a expressão de genes de resposta imediata, tais como c-fos mostraram que a ativação dos receptores D1 e D2 induz ou impede a ativação de genes de resposta imediata em neurônios da via direta e indireta, respectivamente (Gerfen *et al.*, 1995; Robertson *et al.*, 1989, 1990), enquanto o bloqueio dos receptores D2 induz a expressão de genes de resposta imediata em neurônios da via indireta (Dragunow *et al.*,

1990; Robertson e Fibiger, 1992). Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que a ativação dos receptores D1 e D2 tem efeitos opostos na função da via direta e indireta (Gerfen e Bolam, 2017). Os neurônios de projeção espinhosos da via direta seletivamente expressam o receptor D1, são seletivamente localizados em neurônios que projetam a SN e colocalizam com substância P e dinorfina. Os neurônios de projeção espinhosos da via indireta seletivamente expressam o receptor D2, seletivamente localizados em neurônios que projetam ao GPe e colocalizam com encefalina (Brownstein *et al.*, 1977; Graybiel, 1986; Gerfen e Young, 1988; Albin *et al.*, 1989; Delong, 1990; Gerfen *et al.*, 1990).

De acordo com o clássico modelo de funcionamento dos núcleos da base proposto por Albin e Delong (Albin *et al.*, 1989; Delong, 1990), a atividade nas vias direta e indireta tem efeitos opostos no comportamento motor. Este modelo é baseado na noção que desordens neurológicas hipocinéticas, como a doença de Parkinson, seriam consequência de um aumento da atividade na via indireta, enquanto desordens hipercinéticas, como a distonia, por exemplo, são produzidas por um aumento na via direta.

O córtex envia projeções excitatórias ao estriado, que, através da via direta e indireta, fornece regulação excitatória e inibitória nos núcleos de saída dos núcleos da base. Neurônios GABAérgicos no GPi e SNr fornecem altos níveis de atividade tônica fásica. A informação cortical excitatória que chega no estriado é projetada aos núcleos de saída, GPi e SNr, através de uma via inibitória. Então, a ativação dos neurônios da via direta do estriado através da informação excitatória que chega do córtex resulta em inibição da atividade inibitória tônica dos núcleos da base. Na via indireta, o alvo dos neurônios estriatais são neurônios GABAérgico no GPe, que se projetam aos núcleos de saída dos núcleos da base e ao NST. Então, a excitação cortical da via indireta inibe a saída GABAérgica do GPe, resultando em desinibição dos neurônios GABAérgicos no GPi/SNr e NST (Gerfen e Bolam, 2017, **Figura 3**).

Evidências de que o núcleo subtalâmico recebe fibras corticais diretamente reforçou a idéia de que este poderia ser considerado um núcleo de entrada de sinais corticais (Kita, 1993; Mink e Thach 1993; Nambu *et al.*, 2000). Dessa forma, os primeiros trabalhos propuseram uma terceira via: a via hiperdireta. Por meio de técnicas de tracejamento autorradiográfico em macacos, foi visto que o núcleo subtalâmico recebia sinais do córtex motor primário (Nambu *et al.*, 1996). Trabalhos realizados por Nambu e colaboradores mostraram que as projeções cortico-subtalâmicas se

conectariam ao GPi/SNr e ao tálamo, e dessa forma, seria mais rápida a condução dos sinais do que nas vias direta e indireta (Nambu *et al.*, 2000). Dessa forma, o NST, que também recebe aferências excitatórias diretas do córtex cerebral, estimula os núcleos de saída dos núcleos da base. Dada a complexidade da organização deste circuito, os mecanismos específicos responsáveis pela regulação das saídas do estriado não foram esclarecidos (Gerfen e Bolam, 2017).

Figura 3: Figura esquemática ilustrando o clássico funcionamento dos núcleos da base. Neurônios piramidais da camada cinco do córtex fornecem aferências excitatórias glutamatérgicas aos neurônios de projeção espinhosos estriatais da via direta e indireta. Os neurônios da via direta expressando o subtipo D1 do receptor de dopamina projetam-se aos núcleos de saída (GPi/SNr), enquanto os neurônios espinhosos de projeção da via indireta que expressam o subtipo D2 do receptor de dopamina projetam-se indiretamente aos núcleos de saída, GPi/SNr, através do GPe e NST. A dopamina proveniente dos neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta faz contato sináptico com as espinhas dos neurônios espinhosos de projeção da via direta e indireta para modular as aferências corticais. Adaptado de Gerfen e Surmeier, 2011.

Sistema dopaminérgico. Os neurônios dopaminérgicos no mesencéfalo ventral, que podem ser imunohistoquimicamente marcados pela detecção da enzima tirosina hidroxilase, são a origem do sistema dopaminérgico nigroestriatal (Bjorklund e Lindvall, 1984; Gerfen *et al.*, 1987b). As áreas do mesencéfalo que contém neurônios dopaminérgicos incluem a área tegmental ventral, a SN, incluindo a SNc, onde as células são densas e compactas, e a SNr, cuja as células são espaçadas em comparação à SNc, e a área retrorubral, localizada caudal e dorsal à SN (Bjorklund e Lindvall, 1984; Gerfen *et al.*, 1987b). As células da SN e da área retrorubral são geralmente consideradas como a principal projeção ao estriado (Gerfen e Bolam, 2017).

A dopamina apresenta papel crucial na modulação dos sinais talâmicos e corticais provenientes das sinapses glutamatérgicas com os neurônios espinhosos de projeção do estriado. Essa modulação não é importante somente para a seleção de ações e aprendizagem (Gerfen e Surmeier, 2011; Maia e Frank, 2011; Yin e Knowlton, 2006), mas também está envolvida em várias desordens, incluindo a doença de Parkinson, doença de Huntington, esquizofrenia, distonia, déficit de atenção e depressão (Gerfen e Bolam, 2017). O estriado é o núcleo mais innervado pelos neurônios dopaminérgicos da SNc, e a dopamina proveniente desses neurônios exerce efeitos opostos sobre os subtipos D1 e D2 dos receptores de dopamina presentes em neurônios de projeção espinhosos da via direta e indireta (Gerfen e Bolam, 2017). Por exemplo, a ativação dos receptores D1 em neurônios espinhosos de projeção da via direta aumenta a excitabilidade e promove *long-term synaptic potentiation* (LTP) em sinapses glutamatérgicas corticoestriatais. Em contraste, a ativação dos receptores D2 em neurônios espinhosos de projeção da via indireta, diminui a excitabilidade intrínseca e promove *long-term synaptic depression* (LTD) em sinapses corticoestriatais (Gerfen e Bolam, 2017).

Os receptores dopaminérgicos foram inicialmente caracterizados em 1970 baseado em suas respostas a agentes farmacológicos e modulação de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC, o primeiro segundo mensageiro a ser descoberto por Berthet *et al.*, (1957) através da ativação da enzima adenilil ciclase (AC; Kebabian e Calne, 1979). Posteriormente, foram clonados cinco subtipos de receptores que foram divididos em duas famílias e possuem funções antagônicas: a família D1 (D1 e D5) é acoplada a uma proteína G estimulatória (G_s , Golf) e a família D2 (D2, D3 e D4) é acoplada a uma proteína G inibitória ($G_{\alpha i/o}$; Kebabian e Calne, 1979; Beaulieu *et al.*, 2015). A proteína G é um complexo formado pelas subunidades α , β , e γ . Quando

inativa, a subunidade α está ligada à guanosina difosfato (GDP) resultando em um complexo inativo $\alpha\beta\gamma$ (Gilman, 1987). A ativação do receptor pelo neurotransmissor induz a dissociação do complexo $\alpha\beta\gamma$ e permite que a subunidade α_s ou α_i estimule ou iniba a AC para produzir ou reduzir a síntese de AMPc, e assim iniciar uma série de cascatas bioquímicas que modificam proteínas alvo e modulam a síntese e degradação de segundos mensageiros (Gilman, 1987). Estudos moleculares identificaram 9 isoformas diferentes da AC que podem ser divididas dentro de 4 famílias de acordo com fatores modulatórios específicos que podem acontecer através das subunidades $\beta\gamma$ da proteína G, proteína kinase C (PKC) e (Cálcio) Ca^{2+} (Krupinski *et al.*, 1989; Defer *et al.*, 1994; Mons *et al.*, 1998). De acordo com estudos de hibridização *in situ*, das 9 isoformas identificadas, somente 3 estão presentes no sistema nervoso central: AC 1, 2 e 5 (Xia *et al.*, 1991; Glatt e Snyder, 1993; Mons *et al.*, 1993; Cali *et al.*, 1994; Cooper *et al.*, 1995). Das 3 isoformas amplamente expressas no sistema nervoso central, a AC5 é exclusivamente expressa nos neurônios espinhosos de projeção da via direta e indireta, pode ser inibida pelo Ca^{2+} e não é afetada pelas subunidades $\beta\gamma$ (Glatt e Snyder, 1993; Mons e Cooper, 1994).

A estimulação dos receptores de dopamina D1 (Gs/olf/AC) da via direta resulta na ativação da proteína kinase A (PKA) e fosforilação da fosfoproteína de peso molecular 32kDa (DARPP-32) e do elemento de resposta ao AMPc (CREB - *cAMP response element-binding protein*; Greengard *et al.*, 1999). A PKA fosforila a fosfoproteína DARPP-32 no sítio Thr34 e converte a DARPP-32 em um potente inibidor da proteína fosfatase-1 (PP-1). A inibição da PP-1 controla o estado de fosforilação e atividade de outros alvos como, por exemplo, neurotransmissores, o receptor glutamatérgico N-Metil-D-aspartato (NMDA), canais iônicos (canais de Ca^{2+} , canais de Na^{+}), e fatores de transcrição (CREB, Δ FOS-B; Fienberg *et al.*, 1998; Fienberg e Greengard, 2000). É importante lembrar que em neurônios de projeção espinhosos da via direta, o receptor D1 está acoplado a pelo menos três cascatas de sinalização diferentes 1) Gs/olf/AC/AMPc/PKA/DARPP-32/PP-1 (Svenningsson *et al.*, 2004; Stipanovich *et al.*, 2008), (2) Gq/fosfolipase C (PLC)/inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3)/IP3/ Ca^{2+} (Kuroiwa *et al.*, 2008; Hasbi *et al.*, 2010), (3) $G\beta\gamma$ /Src família kinase (SFK)/NMDA subunidade 2B NR2B/ Ca^{2+} /fator 1 de liberação de nucleotídeo Ras-guanina (Ras-GRF1)/proteína kinase ativada por mitógeno/ERK kinase (MEK)/ERK (Girault *et al.*, 2007; Pascoli *et al.*, 2011).

A ativação de receptores acoplados a uma proteína G inibitória ($G_{i/o}$) reduz a produção de AMPc. A DARPP-32 também é expressa nos neurônios de projeção da via indireta que expressam o receptor de dopamina D2. Embora a DARPP-32 seja expressa em ambos os neurônios de projeção da via direta e indireta, estudos mostram que elas apresentam funções opostas, por exemplo, a diminuição da DARPP-32 em neurônios da via direta atenua a discinesia induzida por L-DOPA (L-3,4 dihidroxifenilalanina) em modelo animal enquanto que a perda da DARPP-32 em neurônios da via indireta aumenta a atividade locomotora induzida pela cocaína em modelo animal (Nishi *et al.*, 2011). O estado de fosforilação da DARPP-32 no sítio Thr34 é regulado pelo balanço realizado de fosforilação pela PKA e desfosforilação pela proteína PP-2A e fosfatase 2B (calcineurin; Nishi *et al.*, 2011).

O aumento dos níveis intracelulares de AMPc após a ativação de receptores de dopamina D1 ($G_{s/olf}$) são efetivamente hidrolisados pelas fosfodiesterases (PDEs), enzimas que são divididas em 11 famílias e codificadas por 21 genes (Conti e Beavo, 2007). No estriado, as PDEs 1B, 2A e 10A são amplamente expressas e apresentam substrato dual, sendo responsáveis pela hidrólise de AMPc e GMPc. As PDEs específicas para AMPc, 3A, 3B, 4D, 7B, e 8B são amplamente expressas no estriado. A PDE9A possui substrato específico para GMPc e é moderadamente expressa no estriado (Bender e Beavo, 2006). O grande número de isoformas de PDEs expressas no estriado permite o controle temporal e espacial sobre a função dos neurônios de projeção espinhosos individuais, permitindo assim a coordenação da atividade elétrica e química nas subpopulações de neurônios da via direta e indireta (Padovan-Neto e West, 2017).

A DOENÇA DE PARKINSON

Histórico. Os sinais clínicos, presentes na doença de Parkinson, foram inicialmente descritos por James Parkinson em seu manuscrito - “Ensaio sobre a paralisia agitante” (1817- descrito por Dauer e Przedborski, 2003; Tolouse e Sullivan, 2008). Apenas em 1920, Jean-Martin Charcot reconheceu o pioneirismo de James Parkinson na descrição da paralisia agitante denominando-a com o nome do seu descobridor (descrito por Burch e Sherrin, 2005).

Em 1958, o cientista sueco Arvid Carlsson Carlsson, descobriu que injeções de L-DOPA restauravam o déficit de dopamina no cérebro (Carlsson *et al.*, 1958).

Ehringer e Hornykiewicz, em 1960, mediram os níveis de dopamina e noradrenalina em 17 cérebros humanos utilizados como controles obtidos na autópsia, dois cérebros de pacientes com doença de Huntington, seis cérebros de pacientes com desordem extrapiramidal e seis cérebros de pacientes com doença de Parkinson. Eles descobriram que dos 14 pacientes com doença extrapiramidal, apenas os seis pacientes com doença de Parkinson tiveram uma perda severa de dopamina no núcleo caudado e putamen (Ehringer e Hornykiewicz, 1960).

O avanço da L-DOPA como terapêutica na doença de Parkinson aconteceu em 1967, quando George Cotzias introduziu, com grande sucesso, o tratamento oral com altas doses de L-DOPA, terapia mais efetiva, ainda utilizada atualmente (Cotzias *et al.*, 1967).

Hoje, a doença de Parkinson é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum, afetando 1% da população acima dos 60 anos de idade (Tysnes e Storstein, 2017).

Fisiopatologia da doença de Parkinson. Os sintomas motores da doença de Parkinson são atribuídos à fisiopatologia no estriado dorsal (núcleo caudado e putamen; Zhai *et al.*, 2018) devido à densa inervação dopaminérgica proveniente da SNc nessa estrutura (Albin *et al.*, 1989). Na doença de Parkinson, a via nigroestriatal (projeção dos neurônios dopaminérgicos da SNc ao estriado) sofre degeneração (Kish *et al.*, 1988; Brooks *et al.*, 1990). Embora outros neurônios sejam afetados, a perda moderada a severa dos neurônios dopaminérgicos da SNc ocorre em todos os pacientes com doença de Parkinson e é considerada causa primária do surgimento dos sintomas motores que incluem tremor em repouso, rigidez muscular, lentidão de movimento (bradicinesia), dificuldade de iniciar o movimento (acinesia), distúrbios da marcha e da postura, entre outros (Dexter e Jenner, 2013; Jankovic e Aguilar, 2008). Estes sinais motores são na maioria das vezes precedidos de manifestações não motoras tais como disfunção olfatória em aproximadamente 90% dos pacientes, constipação, distúrbios do sono REM (*Rapid Eye Movement*), depressão/ansiedade e prejuízo cognitivo (Obeso *et al.*, 2017; Dickson *et al.*, 2009).

Pesquisas sugerem que não há uma única causa determinada, mas sim, várias causas que levam à degeneração preferencial dos neurônios da SN (Michel *et al.*, 2016). Numerosos estudos apontam para a exposição a agrotóxicos, como toxinas sintéticas, pesticidas e metais pesados (Fernagut, 2017). No entanto, os seres humanos estão

expostos a vários pesticidas e toxinas na natureza, mas nem todos desenvolvem a doença de Parkinson, sugerindo que os fatores necessários para o desenvolvimento da doença são mais complexos (Fernagut, 2017). Muitos estudos, usando modelos animais ou pacientes, apontam para interações entre os antecedentes genéticos de um indivíduo e a exposição a toxinas ambientais, ou seja, mais de um fator de fator contribui para o desenvolvimento e progressão da doença (para revisão, ver Carvey *et al.*, 2006; Sulzer, 2007). Além disso, o estresse oxidativo, a agregação inadequada de proteínas e a inflamação são reconhecidos como características importantes que podem contribuir para o processo neurodegenerativo (Hirsch e Hunot, 2009; Sanders e Greenamyre, 2013; Xilouri *et al.*, 2013).

O segundo marcador da doença de Parkinson é a presença de Corpos de Lewy que são agregados proteicos ricos em formas fibrilares de α -sinucleína na SN de pacientes com doença de Parkinson (Goedert *et al.*, 2013).

O estriado recebe uma densa inervação dos neurônios dopaminérgicos da SNc. Os neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal modulam o fluxo da informação cortical que chega aos núcleos da base (Gerfen e Bolam, 2017). A perda de dopamina estriatal também está associada com mudanças morfológicas nos núcleos da base, incluindo uma redução na densidade de espinhas dendríticas dos neurônios de projeção espinhosos (Galvan *et al.*, 2015). Ocorre um desequilíbrio na atividade das vias direta e indireta resultando em distúrbios do movimento do tipo hipocinética ou hiperkinética (Albin *et al.*, 1989; Bateup *et al.*, 2010). A disfunção dos núcleos da base está associada a várias doenças humanas, incluindo a doença de Parkinson. A hipótese mais provável é a de que os déficits motores são provenientes de uma hiperatividade na via indireta e uma hipoatividade na via direta (Kravitz *et al.*, 2010).

Doença de Parkinson: terapêutica com L-DOPA. Há mais de 50 anos após sua introdução (Cotzias *et al.*, 1967), a L-DOPA continua sendo a terapia não invasiva mais efetiva utilizada no tratamento dos sintomas motores da doença de Parkinson (Cenci, 2017). A L-DOPA é altamente metabolizada em dopamina pela enzima descarboxilase de ácidos aromáticos periférica, permitindo assim que somente 30% da dopamina metabolizada atinja a circulação sanguínea. Por consequência, a L-DOPA oral é administrada concomitantemente com inibidores da enzima descarboxilase de ácidos aromáticos periféricos, como carbidopa ou benserazida (Contin e Martinelli, 2010). A L-DOPA compartilha de algumas semelhanças com aminoácidos, principalmente em

termos de absorção no intestino e transporte através da barreira hematoencefálica (Nutt e Fellman, 1984). Dessa forma, compete com o mesmo transportador de aminoácidos neutros durante sua absorção e transporte através da barreira hematoencefálica (Contin *et al.*, 1993; Contin e Martinelli, 2010). Uma vez transportada e atingindo o sistema nervoso central, é convertida em dopamina pela ação da enzima descarboxilase de ácidos aromáticos presente nos terminais sinápticos (Jenner, 2004; Marsden, 1994; **Figura 4**).

Embora a L-DOPA seja eficaz no tratamento dos sintomas motores da doença de Parkinson, seu uso contínuo está associado ao aparecimento de movimentos involuntários anormais que em conjunto são chamados de discinesia induzida por L-DOPA (Cenci, 2017). Estudos indicam que essas complicações motoras afetam aproximadamente 40% dos pacientes com doença de Parkinson após 4 - 6 anos da terapia, e acima de 90% dos pacientes após 10 anos de terapia com L-DOPA (revisado em Manson *et al.*, 2012). Uma vez estabelecida, a discinesia se manifesta quando os níveis de dopamina no plasma e no cérebro estão altos (discinesia de pico de dose; Cenci, 2014). Outras complicações podem aparecer, uma delas é chamada “deterioração de fim de dose” (*wearing off*), caracterizada pela redução da duração do efeito motor da L-DOPA, o chamado estado *off*, onde é necessário reduzir o intervalo de administração da L-DOPA com o objetivo de se manter a atividade motora. Outra complicação conhecida como liga-desliga (*on-off*), caracteriza-se por uma mudança brusca do estado de mobilidade do paciente onde há oscilações entre uma boa resposta motora e um estado parkinsoniano (Nutt *et al.*, 1990).

Figura 2: Figura esquemática dos eventos envolvidos na síntese e recaptação de dopamina (DA). A síntese de dopamina inicia-se pela conversão do aminoácido tirosina, que provém da dieta, em DOPA, pela ação da enzima tirosina hidroxilase, que representa a enzima passo limitante na síntese de dopamina. Na sequência, a L-DOPA é convertida em dopamina pela ação da enzima descarboxilase de ácidos aromáticos. A dopamina recém-sintetizada é armazenada em vesículas através do transportador de monoaminas vesicular (VMAT). No interior das vesículas, a dopamina permanece protegida da degradação enzimática via MAO-B (monoamina oxidase-B) e COMT (catecol-O-metil transferase), até ser liberada por exocitose. Uma vez liberada a dopamina pode atuar em receptores pré-sinápticos (auto-receptor do tipo D2 de dopamina) e pós-sinápticos (receptores do tipo D1 e D2 de dopamina). O receptor do tipo D1 de dopamina está ancorado à proteína G estimulatória (G_{olf}). A estimulação desse receptor leva a um aumento dos níveis intracelulares de AMPc. O receptor do tipo D2 de dopamina está ancorado à proteína G inibitória (G_i). A estimulação desse receptor leva a uma diminuição dos níveis intracelulares de AMPc. As ações da dopamina podem ser interrompidas principalmente pela recaptação do neurotransmissor via DAT (transportador de dopamina) ou degradada pela ação da enzima COMT. ATP (Adenosina Tri-Fosfato); DA (dopamina); H^+ (hidrogênio); ADP (Difosfato de Adenosina-Adaptado de Standaert e Galanter, 2009).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA são a duração e severidade da doença, tratamento inicial com doses altas e cumulativas de L-DOPA e início precoce da doença (revisado em Manson *et al.*, 2012). O forte impacto da dosagem de L-DOPA sobre o risco de desenvolvimento de

discinesia (Olanow *et al.*, 2013), indica que o tratamento tem um papel causador primário. O alto risco para o desenvolvimento de discinesia em pacientes jovens com doença de Parkinson é atribuído à alta predisposição para neuroplasticidade no cérebro jovem (Linazasoro, 2005), mas interpretações diferentes são possíveis (Cenci, 2014).

As alterações que ocorrem no estriado após o tratamento com L-DOPA são importantes. Após lesão da via nigroestriatal a dopamina não é mais armazenada nos terminais dopaminérgicos pré-sinápticos (revisado em DeLong e Wichmann, 2007). A cada administração da L-DOPA a concentração extracelular de dopamina aumenta (Abercrombie *et al.*, 1990). A estimulação pulsátil e não fisiológica dos receptores de dopamina no estriado, associado à degeneração da via nigroestriatal poderia gerar o *priming* ou sensibilização na resposta motora (Jenner, 2008). Dados farmacológicos, bioquímicos e eletrofisiológicos obtidos em modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA mostraram que uma única infusão de L-DOPA no estriado lesionado, mas não no GP ou SNr, é capaz de induzir discinesia em ratos parkinsonianos que tiveram a discinesia pré-estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA (Buck *et al.*, 2010). Medidas eletrofisiológicas mostraram mudanças na taxa e padrão de disparo dos neurônios de projeção espinhosos em primatas parkinsonianos tratados com L-DOPA (Liang *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2015) e mudanças bioquímicas tais como aumento de genes de expressão imediata como Δ FOS-B (Andersson *et al.*, 1999; Cenci *et al.*, 1999; Berton *et al.*, 2009; Pavon *et al.*, 2006; Tekumalla *et al.*, 2001), fosforilação de DARPP-32 no sítio Thr34 (Bateup *et al.*, 2010; Santini *et al.*, 2007, 2010; Picconi *et al.*, 2003; Lebel *et al.*, 2010), fosforilação dependente da PKA do receptor GluR1 no sítio Ser845 (Santini *et al.*, 2007, 2010), fosforilação da Kinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK 1/2; Santini *et al.*, 2007, 2010; Gerfen *et al.*, 2000; Pavon *et al.*, 2006; Westin *et al.*, 2007) em roedores parkinsonianos tratados com L-DOPA (Jenner, 2008).

Pelo menos em roedores, os escores para a discinesia induzida por L-DOPA mostram forte correlação com a expressão estriatal de Δ FOS-B (Andersson *et al.*, 1999; Levandis *et al.*, 2008; Lundblad *et al.*, 2004; Pavon *et al.*, 2006; Sgambato-Faure *et al.*, 2005), que são colocalizados com o RNA mensageiro para prodinorfina em neurônios D1 positivos (Andersson *et al.*, 1999; Sgambato-Faure *et al.*, 2005). Enquanto genes de expressão imediata (incluindo *fosB*) mostram uma expressão atenuada seguida a exposição repetida à L-DOPA (Asin *et al.*, 1995; Valastro *et al.*, 2007a), proteínas tipo Δ FOS-B e RNA mensageiro para predinorfina mostram um aumento sustentado. Os níveis de ambos marcadores aumentam gradualmente durante 2 semanas de

administração de L-DOPA (Andersson *et al.*, 2001; Valastro *et al.*, 2007a). Após a suspensão do tratamento com L-DOPA, a expressão de Δ FOS-B e RNA mensageiro para prodinorfina permanecem significativamente elevados durante semanas (Andersson *et al.*, 2003). Essas mudanças sustentadas na expressão de genes estão relacionadas com o “*priming*” (sustentação da discinesia) até mesmo quando o tratamento com L-DOPA é interrompido (Cenci, 2017). O aumento de Δ FOS-B e RNA mensageiro para prodinorfina pela L-DOPA é prevenido por antagonistas de receptores D1 (St-Hilaire *et al.*, 2005; Westin *et al.*, 2007).

Há um consenso de que há um aumento da responsividade dos receptores dopaminérgicos presentes nos neurônios de projeção espinhosos devido a depleção dos neurônios dopaminérgicos da SNc (Santini *et al.*, 2008). Tong *et al.*, (2004) mostraram que a estimulação de receptores D1 está aumentada em pacientes parkinsonianos e no modelo animal da doença de Parkinson (Pifl *et al.*, 1992; Corvol *et al.*, 2004). O aumento da responsividade de receptores dopaminérgicos é resultado de um mecanismo compensatório que ocorre após lesão dos neurônios dopaminérgicos e não pode ser atribuído somente a nível do receptor, uma vez que estudos realizados em ratos lesionados com a neurotoxina 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e pacientes parkinsonianos mostraram que a depleção de dopamina resultou em aumento dos níveis da proteína G estimulatória (Golf; Hervé *et al.*, 1993; Corvol *et al.*, 2004).

O aumento da sensibilidade de receptores dopaminérgicos devido à denervação dopaminérgica não é normalizado pelo tratamento com L-DOPA. Então, cada dose de L-DOPA irá produzir uma excessiva estimulação de ambos receptores, D1 e D2, resultando em grande ativação e inibição, respectivamente, da via de sinalização dependente de AMPc em receptores D1 e D2 presentes em neurônios de projeção espinhosos. Enquanto a contribuição de receptores D2 da via indireta na discinesia não está completamente esclarecida, a hiperativação de receptores D1 da via direta tem sido considerada papel principal para o desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA (Cenci, 2017). A hiperativação de receptores D1 induz o aumento dos marcadores moleculares de discinesia já conhecidos, citados acima. Corroborando essa hipótese, o antagonismo de receptores D1 reduz a discinesia (Westin *et al.*, 2007; Santini *et al.*, 2009), agonistas seletivos levam à manifestação da discinesia em ratos (Taylor *et al.*, 2005; Westin *et al.*, 2007), e roedores com deleção do receptor D1 não desenvolvem discinesia (Darmopil *et al.*, 2009). Utilizando a técnica que permite o acesso genético a populações de neurônios ativos (Fos-TRAP; *Targeted Recombination in Active*

Populations), resultados recentes mostraram que os neurônios espinhosos de projeção ativados durante a discinesia são um seletivo e estável subgrupo de neurônios espinhosos de projeção da via direta (D1; Girasole *et al.*, 2018).

Em termos de plasticidade sináptica, a dopamina proveniente da L-DOPA, ao atuar sobre os receptores dopaminérgicos, promove a plasticidade "positiva", resultando em benefício sintomático duradouro (Cenci *et al.*, 2009). Ao atuar sobre os receptores D2 da via indireta a dopamina promove a indução de *long-term depression* (LTD) e o oposto acontece em receptores de adenosina A2a cuja ativação resulta em *long-term potentiation* (LTP; Shen *et al.*, 2008). Estas ações são reguladas bidirecionalmente pela AC através do receptor D2 que está acoplado a uma proteína Gi e receptores de adenosina A2a que estão acoplados a proteína Golf (Augustin *et al.*, 2014; Higley e Sabatini, 2010). Em neurônios de projeção espinhosos da via direta, receptores D1 são necessários para a indução da LTP (Fino *et al.*, 2010; Pawlak e Kerr, 2008; Shen *et al.*, 2008; Yagishita *et al.*, 2014). No entanto, em estágios avançados da doença, a L-DOPA piora as funções de aprendizagem dependentes do estriado (Cools *et al.*, 2007; Feigin *et al.*, 2003) e afeta negativamente a plasticidade sináptica (Calabresi *et al.*, 2015). Os neurônios de projeção espinhosos da via direta sofrem forte LTP, resultado da hiperativação de D1 (Picconi *et al.*, 2003), e por consequência há aumento dos níveis intracelulares de AMPc (Augustin *et al.* 2014).

PARTICIPAÇÃO DE OUTROS SISTEMAS NO MECANISMO MOLECULAR DA DISCINESIA

Via de sinalização do Óxido Nítrico. O papel fisiológico do Óxido Nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*) foi desvendado em 1980 quando Robert Furchgott descobriu que a habilidade da acetilcolina em relaxar os vasos sanguíneos não dependia somente da sua ação direta sobre os receptores colinérgicos presentes no músculo liso. Para acontecer as ações da acetilcolina era necessária uma substância vasoativa que deveria entrar no músculo e então acontecer o relaxamento. Este fator de relaxamento derivado do endotélio foi posteriormente demonstrado ser o NO (Ignarro *et al.*, 1981, 1987; Palmer *et al.*, 1987). Descobriu-se mais tarde que a arginina era precursora do NO e essencial na sua síntese (Ignarro *et al.*, 1987; Marletta *et al.*, 1988; Stuehr *et al.*, 1989). Posteriormente, Snyder e Ferris estabeleceram as ações do NO como neurotransmissor no cérebro (revisado em Snyder e Ferris, 2000).

Existem três isoformas da enzima que sintetiza NO (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*): a neuronal (NOS I), a induzida (NOS II) e a endotelial (NOS III). As três isoformas diferem em seus mecanismos de ação: a isoforma neuronal e a endotelial são constitutivas e dependentes do complexo (Ca^{+2}) /Calmodulina (CaM) para sua ativação. A isoforma induzida, que é expressa em células do sistema inflamatório e não depende do processo Ca^{+2} /CaM para sua ativação, é ativada por citocinas pró-inflamatórias e pode gerar altos níveis de NO por tempo prolongado (Benarroch, 2011). No cérebro, a isoforma neuronal é distribuída de uma maneira desigual e é expressa moderadamente nos núcleos da base (Bredt *et al.*, 1990; Vincent, 1994). A purificação inicial da isoforma neuronal da enzima NOS a partir do cerebelo humano e de modelos animais revelou que essa proteína, de aproximadamente 150 kDA é ativada pela Ca^{+2} /CaM e usa nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH) como um doador de elétrons (Bredt e Snyder, 1990; Mayer *et al.*, 1990; Schmidt e Murad, 1991).

Sabe-se agora que a isoforma neuronal da enzima NOS possui uma estrutura bidomínio que consiste de distintos domínios oxigenase e redutase (Nathan e Xie, 1994a, b; **figura 5**). Após a ativação, monômeros da isoforma neuronal da enzima NOS dimerizam e, juntamente com duas calmodulinas, formam um complexo tetramérico (Alderton *et al.*, 2001; Griffith e Stuehr, 1995; Stuehr *et al.*, 2004). Elétrons derivados da enzima NADPH são doados ao domínio redutase da isoforma neuronal da NOS, que via flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), transfere elétrons para o domínio oxigenase (Nathan e Xie, 1994a; Stuehr *et al.*, 2004). Após a chegada no domínio da oxigenase, os elétrons interagem com o grupo heme e tetra-hidrobiopterina no local ativo para catalisar a reação da monooxigenase, que converte L-arginina em citrulina e NO (Nathan e Xie, 1994a; Stuehr *et al.*, 2004). Na primeira fase desta reação, a L-arginina é convertida em NG-hidroxiL-arginina e o nitrogênio hidroxilado deste intermediário é processado posteriormente para produzir NO (Stuehr *et al.*, 1991). Assim, a conversão de L-arginina em NO e L-citrulina requer duas reações sucessivas de monooxigenase.

As propriedades do NO como molécula sinalizadora tem importantes consequências: é rapidamente sintetizado sob demanda; atua como um mediador local que não requer um mecanismo complexo de interrupção dos seus efeitos; ele simplesmente é diluído, oxidado a nitrito e nitrato e se difunde atuando a distância (revisado em Miller e Megson, 2007).

Jaffrey *et al.*, (1998) identificaram a CAPON, uma proteína que interage seletivamente com a isoforma neuronal da enzima NOS. A competitiva ligação da CAPON e PSD95 (*postsynaptic density protein 95*) pela isoforma neuronal da NOS sugere um modelo de regulação da translocação dessa enzima entre estruturas sinápticas e não sinápticas. Resumidamente, no modelo da regulação dos receptores NMDA pela CAPON, os receptores NMDA estão acoplados à enzima através da PSD95. Estas interações são mediadas por domínios PDZ. Neste complexo, a isoforma neuronal da NOS é situada próxima ao receptor NMDA que é modulado pelo influxo de Ca^{2+} . A ligação da CAPON pode reduzir a acessibilidade da NOS ao receptor NMDA (complexo NMDA/PSD95/NOS) levando a diminuição do influxo de Ca^{2+} e então diminuindo a capacidade da NOS de exercer seus efeitos fisiológicos e patológicos.

Figura 3: Figura esquemática ilustrando a estrutura e atividade da isoforma neuronal da enzima NOS.

A enzima contém domínios oxigenase e redutase e tem sítios de ligação para muitas moléculas. Apresenta 1,396 aminoácidos. A região N-terminal contém sítios de ligação para interação com proteínas tais como PSD-95, carboxila-terminal PDZ e inibidores da NOS. O domínio oxigenase liga heme e tetrahydrobiopterin (BH₄). O sítio de ligação da calmodulina (CAM) liga o domínio oxigenase ao domínio redutase na metade da enzima NOS. O domínio oxigenase apresenta homologia ao citocromo P450 e contém sítios de ligação para a flavina adenina mononucleotídeo (FMN), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), e NADPH. A isoforma neuronal da enzima NOS contém 42 aminoácidos inseridos (representado pela faixa no centro do domínio FMN) que confere sensibilidade à CAM (Daff *et al.*, 1999). Esta inserção é ausente na isoforma induzida da NOS, que é independente da CAM (Retirado de Snyder e Ferris, 2000).

A via de transdução de sinal do NO melhor estudada no cérebro envolve a ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) e consequente produção do segundo mensageiro guanosina monofosfato cíclica (GMPc; Garthwaite, 2008; Murad, 2006). O GMPc, por sua vez, exerce muitos efeitos, como ativação ou inibição das fosfodiesterases, inibição da hidrólise do fosfoinositol, liberação de neurotransmissores e inibição de canais iônicos, os quais podem ser responsáveis por mediar muitas das funções fisiológicas desencadeadas pelo NO (Lucas *et al.*, 2000 - **Figura 6**).

Figura 4: Figura esquemática ilustrando a síntese e vias de sinalização do NO.

O influxo de cálcio através dos receptores do tipo NMDA e consequente formação do complexo cálcio/calmodulina ($\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$) favorece a formação do NO pela ativação da enzima NOSn a partir do aminoácido L-arginina. Uma vez sintetizado, o NO se difunde e ativa a enzima GCs que leva a produção de GMPc a partir de GTP. Este por sua vez possui vários mecanismos de sinalização, incluindo a ativação da proteína cinase G (PKG) e outros alvos, como por exemplo, canais bloqueados por nucleotídeos cíclicos. As fosfodiesterases (PDEs), que metabolizam os nucleotídeos cíclicos, limitam os efeitos do GMPc sobre a função dos neurônios espinhosos de projeção (Adaptado de West e Tseng, 2011 e Mukherjee *et al.*, 2014).

Em comparação a outras partes do cérebro, o estriado contém a mais alta atividade e expressão da enzima GCs e níveis de GMPc (Gibb e Garthwaite, 2001). Estudos mostraram que sinapses compostas por terminais NOS positivos apresentam altos níveis da enzima GCs (Ariano, 1983; Sancesario *et al.* 2004).

Outros estudos realizados em fatias estriatais do cérebro de ratos mostraram que o NO potencialmente modula a atividade dos neurônios espinhosos de projeção através da ativação da enzima GCs e síntese de GMPc (Calabresi *et al.*, 1999a,b; Padovan-Neto *et al.*, 2015; West e Grace, 2004).

Estudos de hibridização *in situ* em roedores mostraram que os interneurônios produtores de NO contêm baixos níveis de RNA mensageiro do receptor D1 (Le *et al.*, 1991) e expressam a proteína do receptor D5 (Centonze *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2002). Trabalhos mostraram que a regulação de ambos os receptores, D1 e D2,

fortemente regula a atividade da isoforma neuronal da enzima NOS, de maneira oposta (Park e West, 2009; Sammut *et al.*, 2006, 2007a). A estimulação elétrica e química da SNc e a sistêmica administração de SKF 81297, um agonista dos receptores D1/D5 aumenta o efluxo de NO via a isoforma neuronal da enzima NOS e dependente dos receptores D1/D5 (Liu *et al.*, 2005b; Park e West, 2009; Sammut *et al.*, 2006, 2007a). O efeito facilitatório da estimulação elétrica da SNc e química com o SKF 81297 sobre o efluxo de NO foram ambos atenuados pela administração sistêmica de quinpirole, uma agonista de receptores D2, enquanto que a aplicação sistêmica do antagonista de receptores D2, eticlopride, aumentou o efluxo de NO (Sammut *et al.*, 2007a).

Foi demonstrado também que a ativação dos receptores D1/D5 aumenta os níveis de GMPc em tecido estriatal (Altar *et al.*, 1990; Di Stefano *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2010; Siuciak *et al.*, 2006), enquanto o antagonismo dos receptores D1/D5 produz efeito oposto (Altar *et al.*, 1990; Di Stefano *et al.*, 2005). Esses dados sugerem que ambas as estimulações, elétrica ou química da SNc, e ativação farmacológica da transmissão dopaminérgica regula a atividade da isoforma neuronal da enzima NOS usando mecanismos facilitatórios através da ativação dos receptores D1 e D2 (West, 2017).

Interações funcionais recíprocas entre os receptores D1 e NMDA ocorrem em vários neurônios do sistema nervoso central, incluindo no estriado, via interação física e ativação por segundos mensageiros (Cepeda e Levine, 2012). No estriado, as interações entre os neurotransmissores dopamina e glutamato envolvidas na regulação da atividade da isoforma neuronal da enzima NOS, são complexas e acontecem a nível dos interneurônios produtores de óxido nítrico (Fujiyama e Masuko, 1996; French *et al.*, 2005; Hidaka e Totterdell, 2001; Mitkovski *et al.*, 2012) e neurônios de projeção espinhosos (Calabresi *et al.*, 1999a; Morello *et al.*, 1997; Sancesario *et al.*, 2000).

Estudos mostraram que o aumento do efluxo estriatal de NO produzido pela ativação de receptores D1 é bloqueado pela infusão intraestriatal de inibidores da isoforma neuronal da enzima NOS, antagonista de receptores D1 e antagonistas de receptores ionotrópicos de glutamato, sugerindo que o efluxo de NO mediado pela ativação de receptores D1 é dependente da concomitante ativação do receptor NMDA (West, 2017).

Evidências indicam que o NO endógeno (infusão local de um precursor de NO, L-arginina ou N^g-hydroxyl-L-arginina) e exógeno (gerado a partir de doadores de NO) facilitam a liberação de muitos neurotransmissores no estriado, incluindo a dopamina, acetilcolina e glutamato (Kiss, 2000; Prast e Philippu, 2001; Vincent, 2010; West *et al.*,

2002), Por sua vez, a administração do inibidor preferencial da isoforma neuronal da enzima NOS, o 7-nitroindazol (7NI), produz efeito oposto (West e Galloway, 1997a; West *et al.*, 2002; Kiss e Vizi, 2001).

Sobre a neurotransmissão glutamatérgica, o NO pode atuar amplificando essa neurotransmissão excitatória em numerosas regiões do cérebro (Garthwaite, 2008). Estudos usando preparações estriatais mostraram que o NO pode inibir o transportador de glutamato e dessa forma aumentar as concentrações extracelulares desse neurotransmissor (Lonart e Johnson, 1994; Pogun *et al.*, 1994; Taskiran *et al.*, 2003).

O efluxo de dopamina induzido pelo NO é dependente da ativação da isoforma neuronal da enzima NOS, dose de substrato utilizada, e é potenciada seguida a inibição do receptor de glutamato (West e Galloway, 1997b). Foi sugerido por West *et al.*, (2002) que o nível tônico de dopamina no estriado é mantido pelos aferentes glutamatérgicos de forma direta, via receptores glutamatérgicos ionotrópicos localizados nos terminais dopaminérgicos, e de forma indireta, por meio dos interneurônios GABAérgicos NOS positivos. Por outro lado, é sugerido que o NO participa da neurotoxicidade dopaminérgica por facilitar a oxidação da dopamina (Cook *et al.*, 1996).

Chalimoniuk e Langfort (2007) mostraram que a L-DOPA aumenta a via de sinalização NO/GCs/GMPc no estriado de camundongos lesionados com o N-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). Por estimular a liberação de dopamina no estriado, de uma maneira dependente de tempo e concentração, o NO pode contribuir para a patogênese da discinesia induzida por L-DOPA (Sanchez *et al.*, 2002). Alterações no estriado, induzidas pela depleção de dopamina da via nigroestriatal, afetam a neurotransmissão nitrérgica (revisado em Gupta *et al.*, 2014; Del-Bel *et al.*, 2011; Pierucci *et al.*, 2011).

Trabalhos publicados pelo nosso grupo mostraram que o N(G)-nitro-L-Arginine (L-NOARG), inibidor das isoformas neuronal e endotelial da enzima NOS atenua a discinesia já estabelecida pela L-DOPA, assim como o 7-Ni, inibidor preferencial da isoforma neuronal da enzima NOS, bloqueia a discinesia já estabelecida (Padovan-Neto *et al.*, 2009; Solís *et al.*, 2015) e/ou atenua o seu desenvolvimento quando administrado cronicamente em ratos (Padovan-Neto *et al.*, 2015) e em camundongos (Del-Bel *et al.*, 2011) lesionados com a neurotoxina 6-OHDA.

Interessantemente, drogas com perfis farmacológicos opostos, como doador e inibidor de NO, resultam em efeito antidiscinético (Solís *et al.*, 2015). Também foi demonstrado que a aplicação aguda do doador de NO, Nitroprussiato de Sódio (NPS) reduziu a discinesia já estabelecida pela L-DOPA em modelo de ratos lesionados unilateralmente com a 6-OHDA (Bortolanza *et al.*, 2016). O molsidomine, outro doador de NO, reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em camundongos deficientes para o fator de transcrição Pitx3(-/-) (Solís *et al.*, 2015). Pitx3 é um fator de transcrição implicado no desenvolvimento de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo (Hwang *et al.*, 2003, Nunes *et al.*, 2003, van den Munckhof *et al.*, 2003), dessa forma, camundongos Pitx3(-/-) apresentam depleção bilateral seletiva de dopamina na via nigrostriatal (Solís *et al.*, 2015).

Descoberto inicialmente em 1849 por Playfair (Playfair, 1849), o NPS apresenta aplicabilidade clínica e foi utilizado pela primeira vez em um paciente por Johnson, em 1922 (Johnson, 1928). Apresentou segurança e eficácia na redução da pressão arterial quando administrado por via intravenosa em pacientes gravemente hipertensos em 1955 (Page *et al.*, 1955). O NPS também é reconhecido como vasodilatador dependente de NO, porém, independente do endotélio (Miller e Megson, 2007). Como radical livre, pode perder ou ganhar elétrons para se tornar um cátion nitrosônio oxidado (NO⁺) ou um ânion nitroxil reduzido (NO⁻), cada um com um estado de oxidação diferente do átomo de nitrogênio (Arnelle e Stamler, 1995). No corpo, funciona como pró-droga, reagindo com grupos sulfidríla em eritrócitos, albumina e outras proteínas para liberar NO (Ivankovich *et al.*, 1978). O NPS é estável por si só em solução aquosa e no escuro, mas produz NO espontaneamente sob as condições de redução apropriadas. Tanto o óxido nítrico neutro (NO) quanto o ânion nitroxil (NO⁻) podem ser produzidos a partir do NPS, dependendo da condição empregada. A liberação de NO é favorecida em pH e concentração de cisteína mais baixos, enquanto a formação de NO⁻ é mais provável de ocorrer em pH (> 7) e concentração de cisteína mais altos (Smith e Dasgupta, 2001). O mecanismo da reação foi considerado muito complicado e envolveu três etapas claras: nos dois primeiros estágios acontece a redução reversível gradual de dois elétrons de NO⁺ a NO⁻ e são semelhantes em taxas, no terceiro estágio acontece a substituição mais lenta, irreversível e determinante da taxa de NO⁻ pela cisteína no íon nitroprussiato reduzido (Smith e Dasgupta, 2001).

O mecanismo molecular envolvido na redução da discinesia por ambos, inibidor e doador é desconhecido. A manipulação farmacológica do sistema nitrérgico e a sua

relação com a discinesia é complexa, uma vez que o NO pode exercer suas ações em terminais pré e pós-sinápticos e dessa forma interagir com várias vias de sinalização (Garthwaite, 2008).

Processos inflamatórios. Outros sistemas além do dopaminérgico e nitrérgico podem estar envolvidos da doença de Parkinson e na discinesia induzida por L-DOPA.

A neuroinflamação parece contribuir no processo de neurodegeneração da doença de Parkinson (Schiess, 2003; Hirsch e Hunot, 2009). A neuroinflamação, resposta inflamatória que ocorre no tecido nervoso, é caracterizada por três principais fenômenos: (1) a ativação de células gliais residentes; (2) a liberação de citocinas e quimiocinas; e (3) o recrutamento e infiltração de células sanguíneas da periferia para o parênquima cerebral (Saavedra-López *et al.*, 2017). A neurodegeneração pode desencadear uma resposta neuroinflamatória no parênquima, mas esta reação pode também induzir degeneração neural adicional (Schwartz e Shechter, 2010).

As células microgliais são consideradas os macrófagos do sistema nervoso central e se originam a partir do saco vitelino embrionário (Nayak *et al.*, 2014). Estão constantemente escaneando o parênquima do sistema nervoso central e usando seus filamentos para analisar o estado ao redor (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Uma vez que um dano é detectado, há alterações morfológicas e bioquímicas e as microgliais passam para um estado ativado (Kreutzberg, 1996).

Astrócitos também são ativados quando há um dano no cérebro. Essas células apresentam funções benéficas: eliminam espécies reativas de oxigênio (ROS) liberadas pelos neurônios, evitam a excitotoxicidade do glutamato, aumentando a taxa de captação e consequente inativação desse neurotransmissor, produzem fatores que induzem enzimas antioxidantes (Dringen *et al.*, 2000, Liberatore *et al.*, 1999), regulam o crescimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios, como parte das interações bidirecionais neurônio-glia. Por outro lado, podem responder a estímulos patogênicos através da liberação de fatores inflamatórios, como citocinas (Hirsch e Hunot, 2009).

A ativação dos astrócitos também é caracterizada por mudanças morfológicas, no entanto, o anticorpo mais comum utilizado para detectar essas células é a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), revelando apenas uma porção da célula (Saavedra-López *et al.*, 2017). GFAP está aumentado em resposta à neuroinflamação, mas não está claro se este aumento representa ou reflete uma completa mudança morfológica na célula inteira (Saavedra-López *et al.*, 2017). Similar ao que acontece com a microglia, o estado

ativado dos astrócitos envolve a produção de nitrito assim como citocinas e quimiocinas específicas que induzem rápida citotoxicidade que contribui ao ambiente inflamatório (Saavedra-López *et al.*, 2017).

O conceito de alteração inflamatória na doença de Parkinson começou com estudos que identificaram a presença de micróglia ativada na SNc de pacientes com doença de Parkinson (pós-morte; McGeer *et al.*, 1988). Hoje, já é bem estabelecido que a perda de neurônios dopaminérgicos em pacientes com doença de Parkinson é associada a um leve grau de astrogliose, juntamente a uma resposta microglial mais robusta (Forno *et al.*, 1992).

Pacientes parkinsonianos e modelos animais da doença de Parkinson apresentam elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) no estriado e na SNc (Mogi *et al.*, 1994; Hirsch *et al.*, 1998). Neurônios dopaminérgicos expressam receptores TNF- α (Boka *et al.*, 1994), um fato que faz estes neurônios especialmente vulneráveis à morte na inflamação crônica (Hirsch *et al.*, 2003). Estudos pós-morte mostraram que a NOSi também está presente na micróglia ativada (Hirsch *et al.*, 2003). A NOSi é uma fonte de NO, que por sua vez, pode reagir com superóxido de fontes gliais ou neuronais para formar o peroxinitrito altamente reativo e tóxico para as células (Hirsch *et al.*, 2003).

Na doença de Parkinson, foi demonstrada atividade microglial aumentada nos núcleos da base e em áreas do mesencéfalo, como demonstrado in vivo pela tomografia por emissão de pósitrons (PET), marcador [11C]-PK11195 para sítios benzodiazepínicos periféricos, que são seletivamente expressos pela micróglia ativada. Interessantemente, esse aumento estabiliza após um tempo, atingindo um pico e não correlaciona com o aumento da neurodegeneração dopaminérgica (Gerhard *et al.*, 2006). Isso indica que a inflamação mediada pela micróglia permanece ativa independente do processo neurodegenerativo, que pode representar um fator que contribui para a degeneração neuronal (Saavedra-López *et al.*, 2017). Estudos pós-morte em cérebros de pacientes com doença de Parkinson revelaram aumento em células microgliais e astrócitos nas áreas de degeneração (Forno *et al.*, 1992; McGeer *et al.*, 1988).

O tratamento crônico com L-DOPA resulta em níveis elevados de dopamina no estriado amplificando um ambiente pró-inflamatório já existente (Farber e Kettenmann, 2005). A COX-2 é constitutivamente expressa em diversos neurônios e pode ser

expressa na maior parte dos neurônios após uma variedade de insultos (Teismann *et al.*, 2003).

Dados do nosso grupo mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA é capaz de induzir aumento da enzima COX-2 (Bortolanza *et al.*, 2015b), micróglia marcada com OX-42 e astrócitos marcados com GFAP (Bortolanza *et al.*, 2015a; Mulas *et al.*, 2016) no estriado lesionado de ratos discinéticos. Ainda, Bortolanza *et al.*, (2015) mostraram que a aplicação sistêmica de 7-NI é capaz de reduzir o número de células positivas para COX-2 assim como a densidade ótica integrada da micróglia e de astrócitos no estriado lesionado e GPe de ratos discinéticos. Neste contexto, drogas capazes de inibir a sinalização nitrérgica, como o 7-NI, tem como mecanismo de ação alternativo a redução/inibição da expressão de fatores inflamatórios em estruturas dos núcleos da base.

Entretanto, ainda não está estabelecido se o NPS, droga com ação antagonista ao 7-NI, apresenta mecanismo de ação em comum na diminuição da discinesia induzida por L-DOPA.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Esse estudo teve como objetivo aprofundar o conhecimento sobre a via de sinalização do NO no modelo de rato da discinesia induzida por L-DOPA. Mais especificamente, nosso trabalho se propôs a investigar os mecanismos pelos quais os doadores de NO, aqui representado pelo NPS, atuam sobre a discinesia, e se este composto apresenta mecanismos de ação similares aos já descritos para o inibidor preferencial da isoforma neuronal da enzima NOS, o 7-NI.

OJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar o(s) mecanismo(s) envolvido(s) no surgimento da discinesia induzida por L-DOPA em ratos lesionados com 6-OHDA. Com o objetivo de encontrar uma dose apropriada, capaz de induzir discinesia estável na maioria dos nossos animais, foi realizada uma curva dose-resposta com L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos. O critério adotado foi o desenvolvimento de movimentos involuntários anormais com amplitude e frequência maiores que 1, e a seleção de uma dose capaz de manter estável a discinesia ao longo do tratamento com L-DOPA e quantificação da discinesia. Para isso, os animais foram tratados com diferentes doses de L-DOPA (10, 20, 30 e 50 mg/kg, gavagem) e tiveram a amplitude e frequência da discinesia quantificadas. Em seguida foi realizada imunohistoquímica para detecção da enzima tirosina hidroxilase (TH) para análise das fibras dopaminérgicas no estriado.

Avaliar o efeito do tratamento sistêmico agudo e crônico com o doador Nitroprussiato de Sódio sobre a discinesia induzida por L-DOPA, e quais mecanismos moleculares participam de sua ação antidiscinética. Com o objetivo de melhor compreender o mecanismo de ação do doador de NO, analisamos o efeito do tratamento agudo e crônico com NPS nas doses de 2 e 4 mg/kg sobre o desenvolvimento da discinesia (tratamento durante o período de indução da discinesia) ou sobre a discinesia já estabelecida (tratamento após a indução da discinesia) pelo tratamento crônico com L-DOPA. Além disso, realizamos testes motores com o objetivo de verificar a interferência do tratamento agudo e crônico com NPS sobre o efeito benéfico da L-DOPA.

Em seguida, fizemos a análise da expressão do fator de transcrição Δ FOS-B (fator molecular classicamente associado à LID), além de fatores neuroinflamatórios sabidamente aumentados em animais discinéticos e reduzidos em animais previamente tratados com 7-NI (Bortolanza *et al.*, 2015a; 2015b), como as células COX-2 positivas, micróglia marcada com OX-42 e astrócitos marcados com GFAP no estriado lesionado.

Finalmente, avaliamos indiretamente as concentrações teciduais de NO através do seu metabólito, nitrito, os níveis dos mensageiros intracelulares relacionados à discinesia (AMPc e GMPc), possivelmente alterados direta ou indiretamente pelo NPS, e a expressão de CREB fosforilada no estriado dorsolateral de ratos discinéticos.

Analisar o efeito do aumento dos níveis intracelulares de GMPc na discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA através da aplicação intraestriatal de Zaprinaste, inibidor das fosfodiesterases 5, 6 e 9. Para confirmar se o aumento do segundo mensageiro GMPc no estriado lesionado resulta em efeito antidiscinético, verificamos o efeito da aplicação sub-crônica (cinco dias de aplicação/uma vez por dia) sobre a discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA. Os sintomas motores da doença de Parkinson e da discinesia induzida por L-DOPA são atribuídos à fisiopatologia no estriado dorsal (núcleo caudado e putamen; Zhai *et al.*, 2018), principal estrutura de inervação dopaminérgica da SN (Albin *et al.*, 1989). Dessa forma, essa estrutura foi escolhida para implantação da cânula.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foram utilizados ratos da variedade *Wistar* (250g - 280g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto-USP. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura controlada de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12h com livre acesso a água e ração. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências para cuidado e uso de animais de laboratório. Todos os procedimentos experimentais descritos foram submetidos à aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP-nº 2015.1.1044.58.0).

DROGAS

- L-DOPA (Prolopa dispersível, Hoffman-LaRoche, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) contendo 5 mg/kg de Cloridrato de Benserazida-HCL foi diluída em salina 0,9 % e aplicada via oral (gavagem) na dose de 20 mg/kg.
- Nitroprussiato de Sódio (NPS, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído em salina 0,9 % e aplicado nas doses de 2 e 4 mg/kg via intraperitoneal (i.p., Bortolanza *et al.*, 2016).
- 7-Nitroindazol (7-Ni, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído em 50% de polietilenoglicol (PEG) e 50% de salina e aplicado na dose de 30 mg/kg via i.p. (Padovan-Neto *et al.*, 2009).
- Zaprinate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído em 10% de DMSO e aplicado na concentração de 300 μM via intraestriatal (Picconi *et al.*, 2011).
- BAY 736691 (1-(2-Chlorophenyl)-6-[(2R)-3,3,3-trifluoro-2-methylpropyl]-1,5-dihydro-4H-pyrazolo[3,4-d]pyrimidine-4-one) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído em 35% de Dimetil Sulfóxido (DMSO) e aplicado na concentração de 300 μM via intracerebroventricular e 100 e 300 μM via intraestriatal (Picconi *et al.*, 2011).
- NS2028 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluído em 100% de DMSO e aplicado nas concentrações de 10 mM via i.c.v. e 3, 10 e 30 mM via intraestriatal (Olesen *et al.*, 1998).
- 8-Bromoguanosine cyclic 3',5'-monophosphate sodium salt (8-bromo-GMPc; Tocris, Ellisville, MO, USA) foi diluído em água destilada e aplicado nas concentrações de 0,7, 2 e 6 mM via intraestriatal (West e Grace, 2004).

- Vardenafil (30 μ M) foi diluída em água destilada e administrado via intraestriatal na concentração de 30 μ M (Picconi *et al.*, 2011).

As drogas foram diluídas imediatamente antes da utilização. As drogas aplicadas por via sistêmica foram administradas em um volume de 2 ml/kg; as drogas administradas no ventrículo lateral e/ou na porção dorsal do estriado ipsilateral à lesão foram administradas no volume total de 1 μ l.

CIRURGIA ESTEREOTÁXICA E LESÃO UNILATERAL DA VIA NIGRO-ESTRIATAL

A lesão dos neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal foi baseada em estudos anteriores (Gomes e Del Bel, 2003). Para tornar seletiva a lesão dos neurônios dopaminérgicos, desipramina (10 mg/kg i.p.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), cujo mecanismo de ação consiste em bloquear a recaptação de noradrenalina, foi administrada 30 minutos antes da microinjeção de 6-hidroxidopamina (6-OHDA). Posteriormente, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25mg/kg i.p.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e posicionados no aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo USA, 957). Foi administrada uma única microinjeção de 2 μ l de 6-OHDA (8 μ g/ μ l; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em solução salina 0,9% contendo 0,1% de ácido ascórbico (Padovan-Neto, Tese de Doutorado, 2013-Neurociências-FMRP-USP) no feixe prosencefálico medial (FPM) direito nas seguintes coordenadas: antero-posterior (AP): - 2,56 partindo do bregma; latero-lateral (LL): -2,0 da linha média e dorso-ventral (DV): -8,3 a partir do crânio seguindo o atlas de Paxinos e Watson (1997). A 6-OHDA foi microinjetada a uma velocidade de 0.25 μ l/min e a cânula foi mantida imóvel por um tempo adicional de 2 min para evitar refluxo da droga. Os animais receberam injeção intramuscular (0,58 g/kg, volume de 1,0 ml/kg) de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte (Forte Dodge Saúde Animal LTDA) e foram observados até a completa recuperação da anestesia.

Cirurgia para implantação de cânula no estriado dorsal ipsilateral à lesão

Os animais foram anestesiados com tribromoetanol (0,25mg/kg i.p.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e posicionados no aparelho estereotáxico (David-Kopf,

modelo USA, 957). As cânulas foram implantadas no estriado dorsal ipsilateral à lesão (coordenadas: AP: -0.26; LL: -3.6; DV: -4.3) segundo o atlas Paxinos e Watson, (1997) (Del Bel *et al.*, 2004; Echeverry *et al.*, 2007).

As cânulas-guia de 0,6 mm de espessura e 14 mm de comprimento foram fixadas na calota craniana com ajuda de parafusos e resina acrílica. Para impedir a obstrução das cânulas foi colocado um fio de 14 mm. Todo material utilizado foi fabricado com aço inoxidável. Um cateter de polietileno foi colocado entre a microseringa de vidro de 50 µl (Hamilton Syringe 701N 25UL) e a agulha, de espessura de 0,3 mm e comprimento de 15 mm. Foi microinjetado um volume total de 1 µl (0,5 µl/min). A agulha foi mantida imóvel por um tempo adicional de 2 min para evitar refluxo da droga.

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO

Teste de Caminhada. Para avaliar a acinesia do membro anterior contralateral à lesão (como um método para identificar a extensão da lesão dopaminérgica da via nigroestriatal), foi utilizada uma versão modificada do teste de caminhada proposto por Olsson *et al.*, (1995). O teste foi aplicado 14 dias após a cirurgia com 6-OHDA. Os grupos foram selecionados de acordo com a extensão da lesão dopaminérgica através da porcentagem de utilização do membro anterior contralateral à lesão em relação ao total de passadas. O teste também foi aplicado antes e 60 min após a administração de L-DOPA nos dias 1 e 14 do tratamento para avaliar a interferência do tratamento com NPS sobre o efeito benéfico da L-DOPA. Nesse teste, o rato é gentilmente segurado pelo experimentador de modo que seus membros posteriores e um dos anteriores fiquem elevados junto ao corpo do animal. Somente um membro anterior permanece em contato com a superfície plana. Dessa forma o animal é movido lateralmente (*backhand* e *forehand*) sobre essa superfície por uma distância de 90 cm em 5 segundos (Chang *et al.*, 1999; Olsson *et al.*, 1995). Cada membro foi testado de maneira alternada e foram realizadas 3 medidas para cada membro. A média das 3 medidas foi utilizada para avaliar o desempenho motor. Os resultados são apresentados como porcentagem do número das passadas com o membro contralateral à lesão em relação ao número total das passadas.

Campo aberto. O teste de campo aberto foi utilizado para verificar o efeito do NPS sobre a atividade locomotora dos animais. O campo aberto consiste em uma arena circular de plexiglas (40 cm de diâmetro), com paredes de 40 cm de altura. Os animais foram colocados no centro da arena e a distância total percorrida foi determinada durante 10 min usando o software ANYMAZE (Stoelting Co, Ranelagh, Dublin, Irlanda).

TRATAMENTO COM L-DOPA E ANÁLISE DOS MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS ANORMAIS

Tratamento com L-DOPA. Quinze (15) dias após a lesão com a neurotoxina 6-OHDA, os animais receberam diariamente, por via oral (gavagem), uma única aplicação de L-DOPA (20 mg/kg de L-DOPA combinada com 5 mg/kg de benserazida). Exceto no primeiro grupo experimental, onde os animais foram desafiados com diferentes doses de L-DOPA (L-DOPA 10, 20, 30 e 50 mg/kg de L-DOPA combinada com 2,5, 5, 7,5, 12,5 mg/kg de benserazida).

Análise da discinesia induzida por L-DOPA. A análise da discinesia foi realizada com base no sistema de escores de movimentos involuntários adaptado para ratos (Cenci *et al.*, 1998; Lundblad *et al.*, 2002; Winkler *et al.*, 2002). Os ratos foram colocados individualmente em cilindros transparentes e cada um dos movimentos involuntários foi analisado por 1 minuto a cada 20 minutos durante 140 min após a administração de L-DOPA. Quatro tipos de movimentos involuntários foram avaliados: (i) distonia axial: desvio lateral ou torção da cabeça, pescoço e tronco para o lado contralateral à lesão; (ii) discinesia do membro anterior: movimentos de flexão-extensão, abdução-adução ou movimento circular do membro anterior contralateral à lesão. Inclui a abertura/fechamento dos dígitos e pronação ou supinação do punho. (iii) discinesia orofacial: movimentos da mandíbula contralaterais à lesão, protrusão lingual, podendo ser acompanhados por mordidas injuriosas na pele ou no membro anterior contralateral à lesão; (iv) movimentos rotatórios: locomoção circular contralateral à lesão.

Escores de 0-4 foram atribuídos de acordo com o tempo de incidência de cada um dos subtipos de movimento analisados (exceto locomoção): (0) - ausente; (1) - presença aumentada de movimentos bruscos isolados; movimentos involuntários ocasionais

presentes durante menos do que 50% do tempo de observação; (2) - presença intermitente e frequente de movimentos repetitivos; movimentos involuntários frequentes presentes durante mais do que 50% do tempo de observação; (3) - movimentos repetitivos ou distônicos contínuos interrompidos por estímulo sensorial importante, que pode ser auditivo, visual ou tátil; (4) - movimentos repetitivos ou distônicos compulsivos não interrompidos por estímulo sensorial importante. Escores intermediários (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5) também foram atribuídos.

Adicionalmente, foram atribuídos escores para a amplitude dos movimentos involuntários anormais axiais e do membro anterior contralateral à lesão. A amplitude da distonia axial foi avaliada de acordo com o grau de torção da musculatura axial no sentido contralateral à lesão. Foram atribuídos escores de 0 a 4, sendo: 1, torção lateral do pescoço e da cabeça em um ângulo de 30°; 2, torção lateral do pescoço e da cabeça em um ângulo de 60°; 3, torção lateral do pescoço e da cabeça em um ângulo de 90°; 4, torção lateral do pescoço, cabeça e da parte superior do tronco em uma angulação superior a 90° fazendo com que o animal perca o equilíbrio. A amplitude dos movimentos involuntários anormais axiais e do membro anterior foi avaliada de maneira similar, com escores de 0 a 4, sendo: 1, movimentos que acometem a parte distal do membro anterior; 2, movimentos de baixa amplitude, mas que causam translocação visível da parte distal e proximal do membro; 3, translocação total de todo o membro com contração visível da musculatura do ombro; 4, movimentos vigorosos de todo o membro. Escores intermediários também foram atribuídos para ambas as análises.

Manifestações motoras normais aumentadas como *grooming* (autolimpeza) e *gnawing* (“roer”) não foram incluídas nessa análise.

Os resultados foram apresentados como a somatória dos escores dos movimentos involuntários de distonia axial, discinesia do membro anterior e orofacial e discinesia locomotora ao fim dos tempos de avaliação. É importante ressaltar que, uma vez estabelecida, a discinesia se manifesta a cada administração de L-DOPA (Ahlskog e Muentner, 2001). Desta forma, o modelo utilizado permite submeter os mesmos animais a diferentes concentrações de drogas após um tempo de *washout* entre uma administração e outra.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

Sacrifício dos animais. Com exceção dos animais utilizados para determinar as concentrações teciduais de nitrito, os níveis de AMPc e GMPc e a expressão de CREB fosforilada que foram sacrificados por decapitação devido a uma possível interferência do anestésico com os níveis de AMPc e GMPc, os outros grupos foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg) e Xilasina (10 mg/kg) e sacrificados por perfusão. Receberam por meio da artéria aorta a infusão de 250 ml de Tampão Krebs-Ringer contendo heparina (200 µl de heparina 25 000 UI por litro de solução) e nitrito de sódio (1g/l de solução), seguida pela infusão de um volume de 300 a 500 ml de Fixador Somogy-Takagi. Os encéfalos foram removidos e pós-fixados em Fixador Somogy-Takagi por 2h a 4°C e crioprottegidos em solução de sacarose 30% em tampão fosfato 0,1M (PB 0,1M; pH 7,4) à 4°C durante 48 horas. Os encéfalos foram então congelados à -40/-50°C em isopentano e armazenados em freezer -80°C até o processamento histológico.

Processamento do tecido para realização de imunohistoquímica. Secções coronais de 30µm foram processadas em criostato (Leica, modelo CM1850) ao longo de toda extensão medial do encéfalo abrangendo as seguintes estruturas: estriado (Bregma 1,56 a -1,20 mm) e substância negra (Bregma -4,80 a -6,12 mm; Paxinos e Watson, 1997).

Imunohistoquímica. Inicialmente, as secções foram lavadas 3 vezes (5 min cada lavagem) em solução de Tampão A (solução tampão fosfato-salina 0,1M + 0,15% triton-x 100 (PBS-Tx). Em seguida foi realizada a recuperação antigênica (Jiao *et al.*, 1999). As secções foram transferidas para a solução tampão citrato de sódio pH 6,0 e foram mantidas durante 30 min sob leve agitação a uma temperatura que foi adaptada para a condição de cada tecido (50°C a 70°C). Esperou-se a solução chegar à temperatura ambiente e então deu-se continuidade ao protocolo de imunohistoquímica *free-floating* (Gomes *et al.*, 2008). Resumidamente, após lavagem com Tampão A, as secções foram incubadas em solução de Tampão A contendo peróxido de hidrogênio 1% (H₂O₂) durante 30 min para bloqueio da atividade da enzima peroxidase-endógena. Em seguida, as secções foram lavadas e incubadas em solução de Tampão A contendo 2% de soro albumina-bovina e 5% de soro por 1h. Finalmente, as secções foram incubadas com o anticorpo primário contra o antígeno de interesse. Posteriormente, as

secções foram lavadas com Tampão A e incubadas por 90 minutos com anticorpo secundário seguido de duas horas no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA, USA) e finalmente reveladas com tetracloreto de 3'3'-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e/ou níquel + DAB. As secções foram lavadas e montadas em lâminas gelatinizadas. No dia seguinte, as lâminas passaram por uma série de álcoois com concentrações crescentes (70%, 95%, 100% I, 100% II, 100% + xilol, Xilol I, Xilol II por 3 min em cada solução) para desidratar. As lamínulas foram fixadas com Entellan (Merck®).

Tirosina Hidroxilase (TH): Anticorpo primário anti-TH produzido em coelho (1:8000; *rabbit anti-TH*, US Biological). Anticorpo secundário biotinilado anti-coelho produzido em cabra (1:400, *goat anti-rabbit IgG*, Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA).

Fator de transcrição Δ FOS-B: Anticorpo primário anti-FOS-B produzido em coelho (1:4000; *rabbit anti-FOS-B*, SC-48, Santa Cruz, CA). Anticorpo secundário biotinilado anti-coelho produzido em cabra (1:400, *goat anti-rabbit IgG*, Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA).

Ciclooxigenase-2 (COX-2): Anticorpo primário anti-COX-2 produzido em coelho (1:600; *rabbit anti-COX-2*, Cayman Chemical). Anticorpo secundário biotinilado anti-coelho produzido em cabra (1:400, *goat anti-rabbit IgG*, Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA).

CD11b (OX42): Anticorpo primário anti-OX42 produzido em camundongo (1:600; *mouse anti-Rat CD11b*, Serotec). Anticorpo secundário biotinilado anti-camundongo produzido em cavalo (1:400, *horse anti-mouse IgG*, Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA).

Glial fibrillary acidic protein (GFAP): Anticorpo primário anti-GFAP produzido em coelho (1:1000; *rabbit anti-GFAP*, Sigma-Aldrich). Anticorpo secundário biotinilado anti-coelho produzido em cabra (1:400, *goat anti-rabbit IgG*, Vectastain, Vector Laboratories, CA, USA).

Coleta de tecidos e extração de proteínas para ELISA. Os animais foram decapitados e o estriado dorsolateral foi coletado. As amostras foram imediatamente homogeneizadas em HCl 0.1 M e mantidas em gelo até a centrifugação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C (3000 rpm por 10 min, para quantificação de AMPc e GMPc por ELISA). O sobrenadante foi recolhido e armazenado a -80°C até o momento da quantificação.

Deteção dos níveis teciduais dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc. A deteção de AMPc (Invitrogen) e GMPc (Abcam) foi realizada pelo método de ELISA sandwich (Ensaio Imuno-Enzimático) no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de animais dos grupos 6-OHDA/NPS4/SAL, 6-OHDA/7NI30/SAL, 6-OHDA/Vei/L-DOPA, 6-OHDA/NPS4/L-DOPA, 6-OHDA/7NI30/L-DOPA. A deteção dos níveis de AMPc e GMPc foi realizada empregando anticorpos de captura AMPc e GMPc padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. A ligação antígeno-anticorpo foi detectada pelo reconhecimento espécie-específico com um anticorpo associado à peroxidase por 2h. O conjugado não ligado foi removido por lavagem com tampão (fornecido pelo kit) seguido pela incubação com o substrato cromogênico 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) por 45 min. A reação colorimétrica produzida pela peroxidase na presença do TMB foi interrompida pela adição de solução de interrupção da reação. A equação da reta referente à curva padrão produzida a partir de humano recombinante foi utilizada para calcular os níveis de em cada amostra. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. A leitura das amostras foi feita em filtro de 405nm. O limite de deteção do método é de 13,4 pg/ml.

Coleta de tecidos e extração de proteínas para Western Immunoblot. Os animais foram decapitados e o estriado dorsolateral foi coletado. As amostras foram imediatamente homogeneizadas com inibidores de protease (10% v/v; Sigma) e fosfatase (Roche) e mantidas no gelo até o momento da centrifugação. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C (6000 rpm por 10 min). O sobrenadante foi então recolhido e armazenado a -80°C até o momento da quantificação.

Western Immunoblot. Os sobrenadantes foram recuperados para medições de concentração de proteína utilizando ensaio de Bradford (ensaio Bio-Rad Protein, Bio-Rad, Alemanha). As proteínas (7,5µg) foram corridas por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE a 10%) e transferidas a seco para uma membrana de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose após bloqueio com BSA 3% foram incubadas a 4°C *overnight* com o anticorpo anti pCREB (1:500, Upstate) e anti- α -tubulina como controle (1:5000, Cell Signalling Technology, EUA). Os anticorpos ligados foram detectados com anticorpo anti-coelho secundário conjugado com HRP (1: 4000). As bandas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL, Amersham, UK) e quantificadas com o software IMAGEJ. As unidades arbitrárias (U.A.) representaram a análise de densidade integrada extraída das intensidades de banda de pCREB normalizadas pela respectiva expressão de banda de tubulina.

Determinação das concentrações teciduais de nitrito

Coleta de tecido para dosagem de nitrito. Os animais foram decapitados e o estriado dorsolateral foi coletado. As amostras foram pesadas e imediatamente mantidas em gelo seco. Finalmente, as amostras foram armazenadas a -80°C até o momento da quantificação.

O tecido foi macerado em nitrogênio líquido e suspenso em PBS1M pH 7,4. A suspensão resultante foi analisada pelo método de quimiluminescência através de ozônio, como descrito por Pinheiro *et al.*, (2018). Resumidamente, 250 µl de suspensão do tecido foram injetados no aparelho contendo solução de iodo acidificada. O óxido nítrico formado pela redução do nitrito ou compostos nitrosilados com iodo é então carregado pelo gás nitrogênio até o analisador de NO (Sievers Modelo 280 NO analyzer, Boulder, CO). Os dados obtidos foram analisados pelo programa Origin 8.5 (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

ANÁLISE DE IMAGENS

A análise imunohistoquímica do estriado foi realizada com base no estudo de Gomes *et al.*, (2008) e Padovan-Neto *et al.*, (2009). A quantificação das fibras

dopaminérgicas no estriado foi realizada em secções mediais, com exceção do primeiro experimento onde os animais foram tratados com L-DOPA 10, 20, 30 e 50 mg/kg e as quantificações foram realizadas em secções rostrais, mediais e caudais do estriado. O estriado rostral e medial foi dividido em quatro quadrantes: Dorsolateral (DL), Dorsomedial (DM), Ventrolateral (VL) e Ventromedial (VM). Como não foram encontradas diferenças estatísticas entre os quadrantes DL e DM (estriado dorsal), VL e VM (estriado ventral), foi realizada uma média e os resultados estão apresentados como estriado dorsal e estriado ventral. O estriado caudal foi dividido em dois quadrantes: Dorsolateral (DL) e Ventrolateral (VL; **Figura 7**).

As imagens foram capturadas em aumento 20x, com o auxílio de uma câmera de vídeo MTIR CCD-72S acoplada a microscópio Leika DML e enviadas ao computador por um sistema de edição e transferência de imagens (MTIR DSP-2000). Uma vez digitalizadas, as análises foram feitas no programa ImageJ (National Health Institute, EUA) versão 1.43.

Figura 5: Figura esquemática mostrando os bregmas selecionados para quantificação das fibras dopaminérgicas juntamente com os quadrantes.

O estriado rostral (1.00 mm; **Figura A**), assim como o estriado medial (-0.26 mm; **Figura B**) foi dividido em quatro quadrantes (dorsolateral (DL), dorsomedial (DM), ventrolateral (VL) e ventromedial (VM). O estriado caudal (-0.80 mm; **Figura C**) foi dividido em dois quadrantes (dorsolateral (DL) e ventrolateral (VL).

Quantificação das fibras dopaminérgicas no estriado por densidade ótica integrada. A quantificação das fibras TH positivas do estriado foi realizada através da densidade ótica integrada, que corresponde à quantificação pelo cálculo da densidade de tons de cinza em secções de tecido. Para isso, as fotomicrografias foram tiradas em escala de cinza arbitrárias onde a escala varia de 0 a 255 (0 representando a rotulação mais escura e mais intensa). As áreas amostradas consistiram em regiões de interesse que mediram 0,2 mm². Foi mensurada a densidade ótica de uma região encefálica sem marcação para a imunohistoquímica de interesse. O valor médio de cinza mensurado

dessa área foi subtraído de cada secção para corrigir a imunorreatividade de fundo. Nesse caso, a região de escolha foi o corpo caloso. A média dessa leitura, considerada como leitura basal (*Background*), foi subtraída da área de interesse a ser quantificada.

Análise dos núcleos Δ FOS-B positivos e das células COX-2 positivas no estriado. A quantificação dos núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B e das células COX-2 positivas no estriado foi realizada automaticamente por macro configurada para detecção e quantificação do número de células marcadas com anticorpo anti- Δ FOS-B ou anti-COX-2 pelo programa ImageJ. Um limiar para detecção do que eram consideradas marcações específicas foi estabelecido e os resultados gerados pelo programa foram avaliados pelo experimentador, que excluiu as marcações inespecíficas a fim de que somente núcleos marcados para Δ FOS-B ou células marcadas para COX-2 fossem consideradas.

Análise da micróglia marcada com OX-42 e astrócitos marcados com GFAP no estriado. Em secções mediais do estriado foi quantificado bilateralmente a densidade ótica da micróglia marcada com OX-42 e de astrócitos marcados com GFAP. A quantificação da micróglia e de astrócito no estriado foi realizada através da densidade ótica integrada, similar a quantificação das fibras dopaminérgicas no estriado.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os escores para a discinesia foram avaliados com testes não paramétricos. O efeito da administração aguda de NPS2 e 4 mg/kg foi avaliado com Mann Whitney; A análise temporal da discinesia e ao longo dos dias de tratamento foi realizada com Anova de duas vias seguido pelo pós hoc de Bonferroni; O teste de caminhada foi avaliado com teste não paramétrico (Kruskal-Wallis). O teste de campo aberto foi avaliado com Anova de uma via; O efeito da aplicação aguda de NPS 4 mg/kg sobre a expressão dos marcadores moleculares de discinesia foi avaliado com Anova de uma via seguido pelo pós hoc de Bonferroni; O efeito da aplicação crônica de NPS 4 mg/kg sobre a expressão dos marcadores moleculares de discinesia foi avaliado com Anova de duas vias seguido pelo pós hoc de Bonferroni; O efeito do tratamento crônico com NPS 4 mg/kg e/ou 7NI 30 mg/kg sobre os níveis de nitrito e sobre a expressão de pCREB foi

avaliado com Anova de uma via seguido pelo pós hoc de Bonferroni; O efeito do tratamento crônico com NPS 4 mg/kg e/ou 7NI 30 mg/kg sobre os níveis de AMPc e GMPc foi avaliado com Anova de duas vias seguido pelo pós hoc de Bonferroni.

DESENHO EXPERIMENTAL

DETERMINAÇÃO DA DOSE DE L-DOPA E APLICAÇÃO SISTÊMICA DE MODULADORES NITRÉRGICOS.

- **Experimento 1 – Desafio com diferentes doses de L-DOPA:**

Animais lesionados com 6-OHDA (n=17) foram inicialmente tratados cronicamente com L-DOPA 10 mg/kg durante 14 dias. No 14º dia de tratamento com Vei/L-DOPA 10 mg/kg (veículo 2 ml/kg + L-DOPA 10 mg/kg, gavagem), foram atribuídos escores de discinesia. Animais que desenvolveram discinesia em resposta ao tratamento crônico com L-DOPA 10 mg/kg foram sacrificados no 15º dia, 1h após a última aplicação de L-DOPA.

O restante dos animais que não desenvolveu discinesia (n=14) foi desafiado durante 5 dias (15º ao 20º dia) com uma dose maior de L-DOPA (Vei/L-DOPA 20 mg/kg; veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg, gavagem). No 5º dia do tratamento com L-DOPA 20 a discinesia dos animais foi quantificada e os animais que desenvolveram discinesia foram sacrificados no dia seguinte (21º dia), 1h após a última aplicação de L-DOPA.

Animais que não desenvolveram discinesia (n=9) foram desafiados por mais 5 dias (21º ao 26º dia) com uma dose mais alta de L-DOPA (Vei/L-DOPA 30 mg/kg; veículo 2 ml/kg + L-DOPA 30 mg/kg, gavagem). Animais que desenvolveram discinesia em resposta ao tratamento crônico com L-DOPA 30 mg/kg foram sacrificados no dia seguinte (27º dia), 1h após a última aplicação de L-DOPA.

O restante dos animais que não desenvolveu discinesia (n=4) em resposta ao tratamento com L-DOPA 30 foi desafiado por mais 5 dias (27º ao 32º dia) com L-DOPA 50 mg/kg (Vei/L-DOPA 50 mg/kg; veículo 2 ml/kg + L-DOPA 50 mg/kg, gavagem). Ao final do tratamento foram atribuídos escores de discinesia. No dia seguinte os animais foram sacrificados 1h após a última aplicação de L-DOPA.

Os animais que responderam às diferentes doses de L-DOPA foram chamados de grupo L-DOPA 10, grupo L-DOPA 20, grupo L-DOPA 30, grupo L-DOPA 50.

Secções ao nível do estriado e substância negra dos animais dos subgrupos Vei/L-DOPA 10 (n=3), grupo Vei/L-DOPA 20 (n=5), grupo Vei/L-DOPA 30 (n=5), grupo L-DOPA 50 (n=4) foram utilizadas para avaliar a lesão produzida pela 6-OHDA através da imunohistoquímica para detecção da enzima TH. Ver desenho experimental na **Figura 8**.

Figura 6: Desenho experimental adotado no experimento 1.

- **Experimento 2 – Efeito do Nitroprussiato de Sódio sobre a discinesia induzida por L-DOPA em animais parkinsonianos**

2.1 Aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 2 e 4 mg/kg, i.p. sobre a discinesia já estabelecida por L-DOPA:

Procedemos com o objetivo de confirmar o efeito anti-discinético de uma única administração intraperitoneal de NPS 2 ou 4 mg/kg sobre a discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA. Para isso, 14 dias após a cirurgia estereotáxica, todos os animais foram tratados com L-DOPA 20 mg/kg (gavagem). No 14º dia de tratamento (totalizando 28 dias da cirurgia com 6-OHDA) foram atribuídos escores de discinesia e os animais foram divididos de forma que a média dos escores de discinesia ficasse estatisticamente similar entre os grupos (grupos experimentais descritos abaixo). Animais discinéticos (n=12) foram divididos em dois subgrupos experimentais: i) Vei/L-DOPA (veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=6); ii) NPS2/L-DOPA (NPS 2 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=6). Um segundo grupo independente de animais discinéticos (n=26) foi dividido em dois subgrupos experimentais: i) Vei/L-DOPA (veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=14); ii) NPS4/L-DOPA (NPS 4 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=12).

O NPS foi administrado i.p., 10 min antes da L-DOPA no décimo-quinto dia de tratamento. Os movimentos involuntários anormais foram quantificados neste mesmo dia, comparando grupos vei/L-DOPA e NPS 2 ou 4/L-DOPA. Os animais foram sacrificados no 16º dia, 1h após a última aplicação de L-DOPA (sob efeito ou não de

NPS) para confirmação da lesão dopaminérgica produzida pela microinjeção de 6-OHDA no FPM.

Secções ao nível do estriado e substância negra dos animais dos subgrupos Vei/L-DOPA (n=6) e NPS2/L-DOPA (n=6) foram utilizadas para avaliar a lesão produzida pela 6-OHDA através da imunohistoquímica para marcação da enzima TH. Secções ao nível do estriado foram utilizadas para avaliar a lesão produzida pela 6-OHDA.

Secções ao nível do estriado dos animais dos subgrupos Vei/L-DOPA (n=14) e NPS4/L-DOPA (n=12) foram utilizadas para avaliar a lesão produzida pela 6-OHDA e também o efeito do tratamento com NPS4 mg/kg sobre a marcação nuclear para Δ FOS-B, células COX-2 positivas, micróglia marcada com OX-42 e astrócito marcado com GFAP. Ver desenho experimental na **Figura 9**.

Figura 7: Desenho experimental adotado no experimento 2.1.

2.2 – Tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio 2 e 4 mg/kg, i.p. durante o desenvolvimento da discinesia:

Quatorze (14) dias após a microinjeção de 6-OHDA os animais foram submetidos ao teste de caminhada para seleção de animais lesionados. Os grupos experimentais foram selecionados de acordo com a extensão da lesão através da porcentagem de ajustes de passadas com o membro anterior contralateral à lesão com relação ao total de passadas. Dessa forma, todos os grupos tiveram uma média de

intensidade da lesão similar (posteriormente confirmada pela técnica de imunohistoquímica para a enzima TH). Para os animais selecionados não houve presença visível de fibras dopaminérgicas no estriado lesionado, sugerindo perda maior que 90%.

Os animais com depleção dopaminérgica (n=16) foram divididos nos seguintes subgrupos experimentais: i) Vei/L-DOPA (veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8); ii) NPS2/L-DOPA (NPS 2 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8). Outro grupo de animais com depleção dopaminérgica foram selecionados (n=28) e divididos nos seguintes subgrupos experimentais: i) Vei/SAL (veículo 2 ml/kg + salina 2 ml/kg; n=6); ii) Vei/NPS4 (veículo 2 ml/kg + NP4 mg/kg; n=6); iii) Vei/L-DOPA (veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8); iv) NPS4/L-DOPA (NPS 4 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8).

Os tratamentos foram administrados durante 14 dias, uma vez ao dia. O NPS foi administrado i.p., 10 min antes da L-DOPA. Os animais controles foram tratados com o respectivo veículo de diluição das drogas. Os movimentos involuntários anormais foram quantificados nos dias 1, 7 e 14 do desafio com L-DOPA (com ou sem NPS).

Os animais foram mais uma vez submetidos ao teste de caminhada e campo aberto no início (Dia 1) e no fim (Dia 13) do tratamento com NPS2 ou 4. Nosso objetivo com essas análises foi verificar, através do teste de caminhada, a interferência do NPS na dose de 2 ou 4 mg/kg sobre o efeito benéfico da L-DOPA, visto através da acinesia do membro anterior contralateral à lesão. Os animais também foram expostos ao teste do campo aberto, cuja finalidade foi verificar o efeito do NPS2 ou 4 sobre a atividade locomotora dos animais.

Os animais do experimento com NPS 2mg/kg (grupos Vei/L-DOPA e NPS2/L-DOPA) e do experimento NPS 4 mg/kg (grupos Vei/SAL; NPS4/SAL; Vei/L-DOPA; e NPS4/L-DOPA) foram sacrificados no 15º dia de tratamento, 1h após a última aplicação de L-DOPA para confirmação e análise da lesão dopaminérgica.

Foi realizada imunohistoquímica para detecção da enzima TH em secções do estriado e substância negra nos grupos do experimento NPS 2 mg/kg. Foi realizada imunohistoquímica para TH em secções do estriado e substância negra do grupo NPS 4 mg/kg para confirmação e análise da lesão dopaminérgica. Para este último experimento, secções a nível do estriado também foram utilizadas para detecção e análise de núcleos positivos para Δ FOS-B, células positivas para COX-2, microglia marcada com OX-42 e astrócito marcado com GFAP. Ver desenho experimental na **Figura 10**.

Figura 8: Desenho experimental adotado no experimento 2.2.

- **Experimento 3. Análise do efeito molecular do Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg e/ou 7-Nitroindazol 30 mg/kg na diminuição da discinesia induzida por L-DOPA**

3.1 – Determinação do nível dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão após tratamento de animais parkinsonianos com Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg e/ou 7-Nitroindazol 30 mg/kg

Seguimos com o objetivo de verificar o efeito do tratamento crônico com NPS4 e/ou 7NI30 sobre os níveis de AMPc e GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos lesionados com a neurotoxina 6-OHDA.

Quatorze (14) dias após a lesão produzida pela 6-OHDA os animais foram submetidos ao teste de caminhada para seleção de animais lesionados. Os grupos experimentais foram selecionados de acordo com a extensão da lesão verificada através do teste de caminhada, conforme descrito anteriormente. Todos os grupos tiveram uma média de intensidade da lesão similar (>90%).

Após teste de caminhada, animais hemiparkinsonianos (n=48) foram selecionados e divididos nos seguintes subgrupos experimentais: i) Vei/SAL (veículo 2

ml/kg + salina 2 ml/kg; n=8); ii) NPS4/SAL (NPS 4 mg/kg + salina 2 ml/kg; n=8); iii) 7-Ni30/SAL (7-Ni30 mg/kg + salina 2 ml/kg; n=8); Vei/L-DOPA (veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8); iv) NPS 4/L-DOPA (NPS 4 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8); 7-Ni30/L-DOPA (7-NI 30 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=8). Todos os grupos foram lesionados com 6-OHDA. Os animais receberam uma única injeção intraperitoneal por dia de NPS4 e/ou 7-Ni30, durante 14 dias, antes do tratamento com L-DOPA. O NPS4 foi administrado 10 min antes e o 7-Ni30 foi administrado 30 min antes da L-DOPA. Os animais controles receberam injeções intraperitoneais do respectivo veículo de diluição das drogas (ou de salina no lugar da L-DOPA).

Os escores de discinesia foram atribuídos no 13º dia de tratamento. Nossa hipótese é que logo após o tratamento com L-DOPA/indução da discinesia, ocorre aumento rápido de AMPc, resultante da estimulação do receptor D1 de dopamina em neurônios de projeção espinhosos da via direta. Esse aumento é seguido pelo aumento de fatores de transcrição, como por exemplo, Δ FOS-B e pela hidrólise rápida de AMPc. Portanto, no dia do sacrifício (14º dia), os animais foram tratados com NPS4 e/ou 7-Ni30 5 min antes da L-DOPA e foram sacrificados 15 min após a administração de L-DOPA. O mesmo protocolo experimental foi adotado para os animais do grupo controle. Ver desenho experimental na **Figura 11**.

3.2. – Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg e 7-Nitroindazol 30 mg/kg crônico: Determinação das concentrações teciduais de nitrito e expressão da proteína pCREB:

Nosso objetivo foi verificar as concentrações de nitrito, principal metabólito do NO, e também a expressão da proteína pCREB na porção dorsolateral do estriado ipsilateral à lesão de animais hemiparkinsonianos, tratados cronicamente com NPS4/L-DOPA e/ou 7NI30/L-DOPA.

Quatorze (14) dias após a lesão produzida pela 6-OHDA os animais foram submetidos ao teste de caminhada para seleção de animais lesionados. Os grupos experimentais foram selecionados pelo teste da caminhada, conforme descrito anteriormente. Dessa forma, todos os grupos tiveram uma média de intensidade da lesão similar.

Após o teste de caminhada, animais hemiparkinsonianos (n=21) foram selecionados e divididos nos seguintes subgrupos experimentais: i) Vei/L-DOPA

(veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=7); ii) NPS 4/L-DOPA (NPS 4 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=7); iii) 7-Ni30/L-DOPA (7-NI 30 mg/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=7). A análise também foi realizada no grupo SHAM (salina-FPM, n=6).

Os animais receberam uma única injeção intraperitoneal por dia de NPS4 e/ou 7-Ni30, durante 14 dias. O NPS4 foi administrado 10 min antes e o 7-Ni30 foi administrado 30 min antes da L-DOPA. Foram atribuídos escores de discinesia no 13º dia. No 14º dia os animais foram sacrificados, 60 min após a última aplicação de L-DOPA (pico da discinesia). Ver desenho experimental na **Figura 11**.

Figura 9: Desenho experimental adotado nos experimentos 3.1 e 3.2.

Experimento 4: APLICAÇÃO INTRAESTRIATAL DE ZAPRINASTE, DROGA QUE INIBE AS FOSFODIESTERASES 5, 6, e 9.

Animais lesionados com a 6-OHDA foram tratados cronicamente com L-DOPA 20 mg/kg (gavagem) durante 14 dias para indução dos movimentos involuntários anormais. No 14º dia do tratamento, os animais foram selecionados de acordo com os escores de discinesia.

No 15º dia (um dia após a última dose de L-DOPA) os animais foram submetidos a outra cirurgia estereotáxica para implantação de cânula no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão (AP: 0.00 a -0.12; LL: -3.6; DV: -4.3). Cinco a sete dias após a cirurgia para implantação de cânula, o tratamento com L-DOPA foi retomado para restabelecimento dos movimentos involuntários anormais. Quando os movimentos

involuntários se mostraram estáveis (após 3 dias), o efeito da aplicação intraestriatal de Zaprinaste, inibidor das fosfodiesterases 5, 6 e 9. A inibição das fosfodiesterases 5, 6 e 9 resulta em aumento dos níveis de GMPc. O Zaprinaste na concentração de 300 μ M foi administrado durante 5 dias consecutivos, sendo uma microinjeção por dia, numa taxa de 0,5 μ l/ min (volume total de 1 μ l). A L-DOPA foi administrada 15-20 min após a injeção intraestriatal de zaprinaste.

Os movimentos involuntários anormais foram quantificados no dia anterior à microinjeção (grupo analisado: veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=5), no dia 1 e 5 da microinjeção (grupo analisado: zaprinaste 300 μ M + L-DOPA 20 mg/kg; n=5) e no dia 6, um dia após a última microinjeção de zaprinaste (mas ainda sob efeito da L-DOPA. Grupo analisado: veículo 2 ml/kg + L-DOPA 20 mg/kg; n=5). Os escores atribuídos no 5º dia de microinjeção de zaprinaste foram comparados aos escores atribuídos no dia anterior à microinjeção.

Os animais foram sacrificados no dia seguinte para confirmação da lesão e análise histológica para localização de cânula. Ver desenho experimental na **Figura 12**.

Figura 10: Desenho experimental adotado no experimento 4.

RESULTADOS

1) A INTENSIDADE DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA É DEPENDENTE DA LESÃO DOS NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS PRODUZIDA PELA 6-OHDA.

Com o objetivo de determinar uma dose de L-DOPA capaz de induzir nos animais movimentos involuntários anormais de forma estável e constante, e, posteriormente, verificar as diferenças histológicas entre os animais que manifestaram ou não discinesia em resposta ao tratamento, realizamos a curva dose-resposta para a L-DOPA. Para a comparação, escores semelhantes para os movimentos involuntários anormais deveriam ser produzidos. De acordo com alguns autores, além da extensão da lesão, a magnitude da dose de L-DOPA administrada estaria envolvida no desenvolvimento da discinesia (revisado em Cenci, 2014). A extensão da lesão produzida pela 6-OHDA seria uma das variáveis, que uma vez presente, levaria a uma manifestação mais rápida da discinesia com doses baixas de L-DOPA (Pearce *et al.*, 2001, Togasaki *et al.*, 2001, 2005).

Animais lesionados com 6-OHDA (n=17) foram inicialmente tratados com L-DOPA 10 mg/kg (grupo L-DOPA 10) durante 14 dias. Dos animais tratados cronicamente com L-DOPA 10 mg/kg, 17% (n=3) desenvolveu movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial (dados não apresentados).

O restante dos animais (n=14) foi desafiado sequencialmente com uma dose maior de L-DOPA (L-DOPA 20 mg/kg; grupo L-DOPA 20). Os animais receberam uma aplicação diária de L-DOPA 20 mg/kg, via oral (gavagem), durante 5 dias. 29% (n=5) desenvolveu movimentos involuntários anormais, considerados estáveis para análise (parâmetros descritos na seção “Desenho Experimental”).

O restante dos animais (n=9) foi desafiado com uma dose maior de L-DOPA (L-DOPA 30 mg/kg; grupo L-DOPA 30). Desses, (29%, n=5) desenvolveu movimentos involuntários anormais. Os escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais desses animais foram semelhantes aos escores atribuídos aos animais que responderam ao tratamento com L-DOPA 20 mg/kg ($p < 0,05$).

O restante dos animais (n=4) foi desafiado por mais 5 dias com uma dose ainda maior de L-DOPA (L-DOPA 50 mg/kg; grupo L-DOPA 50). Desses animais, apenas 11% (n=2) desenvolveu movimentos involuntários anormais. Os animais remanescentes (n=2) não desenvolveram discinesia (**Figura 13**).

ótica integrada das fibras TH positivas do estriado ipsilateral dos animais do grupo L-DOPA 50 não foi estatisticamente diferente do lado contralateral ($p > 0,05$), indicando que nesse grupo houve preservação das fibras dopaminérgicas. A expressão de TH também foi maior no lado lesionado quando comparado ao lado lesionado de grupos tratados com menores doses de L-DOPA ($\#p < 0,05$ vs. grupos L-DOPA 20 e L-DOPA 30; **Figura 14 - A**).

Para as porções dorsal e medial de secções mediais do estriado, a análise estatística revelou efeito para o fator lado (Dorsal: $F(1,20) = 56,94$; $p < 0,05$. Ventral: ($\#p < 0,05$ vs. grupos L-DOPA 20 e L-DOPA 30; **Figura 14 - A**) e para o fator dose de L-DOPA (Dorsal: $F(2,20) = 16,94$; $p < 0,05$. Ventral: $F(2,20) = 18,82$; $p < 0,05$). Não houve interação entre os dois fatores (Dorsal: $F(2,20) = 0,67$; $p > 0,05$. Ventral: $F(2,20) = 0,24$; $p > 0,05$). A análise pós hoc mostrou que nos grupos L-DOPA 20 e L-DOPA 30 houve diferença estatística do lado ipsilateral quando comparado ao contralateral ($*p < 0,05$; **Figura 14 - C**). A densidade ótica integrada das fibras TH positivas do estriado ipsilateral dos animais do grupo L-DOPA 50 não foi diferente do contralateral à lesão ($p > 0,05$; figura 14 - C). A análise da densidade ótica integrada de fibras TH positivas no estriado dorsal ipsilateral à lesão entre os grupos revelou diferença estatística do grupo L-DOPA 50 em comparação ao lado ipsilateral dos demais grupos ($\#p < 0,05$ vs. grupos L-DOPA 20 e L-DOPA 30; **Figura 14 - C**), indicando mais uma vez preservação dopaminérgica.

Para as porções dorsolateral e ventrolateral de secções caudais, a análise estatística revelou efeito para o fator lado (Dorsolateral: $F(1,22) = 30,10$; $p < 0,05$. Ventrolateral: $F(1,22) = 56,96$; $p < 0,05$), para o fator dose de L-DOPA (Dorsolateral: $F(2,22) = 12,80$; $p < 0,05$. Ventrolateral: $F(2,22) = 13,78$; $p < 0,05$), mas sem interação entre os dois fatores (Dorsolateral: $F(2,22) = 0,62$; $p > 0,05$. Ventrolateral: $F(2,22) = 0,30$; $p > 0,05$). Novamente, vimos uma diferença estatística na densidade ótica integrada de fibras TH positivas no lado ipsilateral dos grupos L-DOPA 20 e 30 quando comparado ao lado contralateral ($*p < 0,05$ vs. grupos L-DOPA 20 e L-DOPA 30; **Figura 14 - E**). Seguindo o padrão, a densidade ótica integrada das fibras TH positivas no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão entre os grupos apontou uma maior expressão de TH no grupo L-DOPA 50 em relação ao lado ipsilateral dos demais grupos ($\#p < 0,05$ vs. grupo L-DOPA 20; **Figura 14 - E**), não sendo estatisticamente diferente do lado contralateral ($p > 0,05$).

Baseado neste resultado, foram selecionados para experimentos seguintes animais parkinsonianos com lesão total (identificada pelo teste da caminhada e confirmada posteriormente pela ausência de fibras dopaminérgicas no estriado lesionado) e que responderam à concentração de L-DOPA de 20 mg/kg; **Figura 15**).

Figura 12: Densidade óptica integrada de fibras TH positivas em seções rostrais, mediais e caudais de animais que desenvolveram discinesia em resposta a diferentes doses de L-DOPA.

Animais que desenvolveram discinesia com as doses de 20 e 30 mg/kg de L-DOPA apresentaram menor densidade de fibras TH positivas no estriado dorsal e ventral ipsilateral à lesão quando comparado ao lado contralateral em todos os níveis analisados (**A-B** rostral; **C-D** medial; **E-F** caudal). Animais que não desenvolveram discinesia com as doses de 20 e 30 de L-DOPA e responderam apenas ao tratamento com L-DOPA 50 mg/kg apresentaram

aproximadamente maior densidade de fibras TH positivas (aproximadamente 50% de fibras remanescentes) no estriado dorsal e ventral em todos os níveis analisados (**A-B** rostral; **C-D** medial; **E-F** caudal). Grupos (L-DOPA 20, n=5; L-DOPA 30, n=3; L-DOPA 50, n=2). * $p < 0,05$ vs lado contralateral. # $p < 0,05$ vs grupos L-DOPA 20 e L-DOPA 30. (Anova de duas vias seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM.

Figura 13: Fotomicrografia de secções rostrais, mediais e caudais de animais que desenvolveram discinesia em resposta a diferentes doses de L-DOPA.

As fotomicrografias mostram secções rostrais, mediais e caudais do estriado de ratos que receberam microinjeção de unilateral de 6-OHDA no FPM direito. A microinjeção de 6-OHDA produziu diferentes níveis de lesão. Animais que desenvolveram discinesia apenas em resposta ao tratamento com L-DOPA 50 mg/kg apresentaram preservação das fibras TH positivas do estriado (**C', C'', C'''**). Animais que apresentaram discinesia em resposta ao tratamento com L-DOPA 20 (**A', A'', A'''**) e/ou 30 mg/kg (**B', B'', B'''**) apresentaram robusta degeneração das fibras dopaminérgicas do estriado. As imagens foram capturadas em secções do estriado (Rostral 1.00 mm; Medial -0.26 mm; Caudal -0.80 mm).

2) A ACINESIA OBSERVADA NO TESTE DE CAMINHADA ESTÁ ASSOCIADA À PERDA ROBUSTA DAS FIBRAS DOPAMINÉRGICAS NO ESTRIADO DE RATOS LESIONADOS COM A 6-OHDA, COMPROVADA PELA IMUNOHISTOQUÍMICA PARA A ENZIMA TH.

Considerando que nossos resultados demonstraram que a extensão da lesão é fundamental para o desenvolvimento da discinesia com baixas doses de L-DOPA, a

Considerando que nossos resultados demonstraram que a extensão da lesão é fundamental para o desenvolvimento da discinesia com baixas doses de L-DOPA, a partir deste resultado o critério de seleção adotado para inclusão dos animais no estudo foi o de lesão total da via nigroestriatal e desenvolvimento de discinesia em resposta ao tratamento com L-DOPA 20 mg/kg.

O teste de caminhada revelou acinesia do membro anterior contralateral à lesão, com uma redução de mais de 80% do uso da pata contralateral à lesão em comparação a pata ipsilateral ($W = -4560$, $p < 0,05$, $n = 95$; **Figura 16**). Este é um efeito observado em animais que possuem depleção dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta e consequente déficit de dopamina no estriado lesionado (Chang *et al.*, 1999). Animais que receberam microinjeção de salina no FPM não apresentaram nenhuma alteração motora quando submetidos ao teste de caminhada (dados não apresentados).

Figura 14: Média de uso do membro anterior contralateral em relação ao membro anterior ipsilateral à lesão produzida pela microinjeção de 6-OHDA.

A lesão dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta e consequente depleção de dopamina no estriado ipsilateral à lesão produziu robusta acinesia do membro anterior contralateral à lesão. Valores representam a média do número de ajustes de passadas com o membro anterior ipsilateral (barra branca) e contralateral (barra preta) à lesão quantificados no 14º dia após a cirurgia estereotáxica. Barras representam média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ (*Teste-t* pareado, $n = 95$).

A análise da imunohistoquímica para a enzima TH revelou que os animais lesionados com 6-OHDA e apresentando movimentos involuntários anormais tiveram lesão robusta dos neurônios dopaminérgicos da SNc e de suas fibras no estriado ipsilateral à lesão em todos os níveis do estriado (estriado rostral, medial e caudal (**Figura 17: A, B e C**, respectivamente) e da substância negra rostral, medial e caudal (**Figura 17: A', B' e C'**, respectivamente)). Houve preservação da área tegmental ventral nos três níveis analisados. Como o esperado, secções correspondentes de animais salina-FPM não apresentaram redução de células dopaminérgicas na SNc e de fibras TH positivas no estriado (dados não apresentados).

Figura 15: Efeito da microinjeção de 6-OHDA no FPM sobre as células TH positivas da substância negra e suas fibras no estriado.

As fotomicrografias mostram os três níveis rostro-caudais de animais que receberam microinjeção de 6-OHDA no estriado (figuras **A, B e C**) e na substância negra (**A', B' e C'**). A microinjeção de 6-OHDA (16 µg) no FPM produziu degeneração robusta das fibras TH positivas do estriado nos níveis (**A**) rostral, (**B**) medial e (**C**) caudal. Houve também degeneração robusta das células TH positivas da substância negra e preservação do VTA nos três níveis analisados: (**A'**) rostral, (**B'**) medial e (**C'**) caudal. As imagens foram capturadas em secções do estriado (1.00 mm; Medial -0.26 mm; Caudal -0.80 mm) e substância negra (4.80 mm; -5.16 mm; -6.12 mm).

3) A APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSATO DE SÓDIO 2 E 4 mg/kg REDUZIU A DISCINESIA JÁ ESTABELECIDADA PELA L-DOPA.

Seguimos com o objetivo de verificar se a aplicação aguda do doador de NO NPS, nas doses de 2 e 4 mg/kg, seria suficiente para diminuir a discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA. Para isso, no 15º dia após o início do tratamento com L-DOPA, os animais discinéticos foram desafiados com uma única aplicação de NPS nas doses de 2 e 4 mg/kg.

A administração aguda de NPS 2 mg/kg, 10 min antes da L-DOPA foi capaz de reduzir aproximadamente 60% dos movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofaciais contralaterais à lesão ($U = 5.0$, $*p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA; **Figura 18 - A**).

A análise dos movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofaciais ao longo dos 140 min analisados mostrou efeito geral do tempo ($F(6,70) = 4,54$, $p < 0,05$) e tratamento ($F(1,70) = 16,76$, $p < 0,05$) sem interação entre os dois ($F(6,70) = 0,87$, $p > 0,05$; **Figura 18 - B**). A discinesia axial, do membro anterior e orofacial dos animais que receberam aplicação de NPS2 foi visivelmente mais baixa em comparação ao grupo Vei/L-DOPA em todos os pontos analisados, apesar de haver diferença estatística apenas nos 20 min ($p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA).

Também foi observada redução de aproximadamente 60% dos escores atribuídos para o comportamento rotatório induzido pela L-DOPA ($U = 6.0$, $*p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA; **Figura 18 - C**). A análise do comportamento rotatório ao longo dos 140 min analisados mostrou efeito geral do tempo ($F(6,70) = 3,73$, $p < 0,05$) e tratamento ($F(1,70) = 12,61$, $p < 0,05$), sem interação entre os dois ($F(6,70) = 1,64$, $p > 0,05$; **Figura 18 - D**). Novamente, o comportamento rotatório induzido por L-DOPA foi menor em comparação ao grupo Vei/L-DOPA em todos os pontos analisados, apesar de haver diferença estatística apenas nos 20 min ($p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA).

Figura 16: Efeito da aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio (2 mg/kg, i.p.) sobre a discinesia já estabelecida pela L-DOPA.

(A) A aplicação aguda de NPS 2 mg/kg reduziu significativamente os movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial (* $p < 0,05$) e o (B) comportamento rotatório, ambos induzidos pelo tratamento crônico com L-DOPA (* $p < 0,05$). (C) A análise da discinesia axial, do membro anterior e orofacial e a análise do (D) comportamento rotatório ao longo dos 140 min revelou diferença estatística apenas nos 20 min quando comparado ao grupo Vei/L-DOPA (* $p < 0,05$; $n=6$). A e C (Mann Whitney). B e D (Análise de duas vias seguido de Bonferroni). A-C estão representados como valores individuais (pontos) e mediana (traço). B-D estão representados como média $\pm$ EPM. $n = 6$ /grupo.

Um grupo independente de animais discinéticos foi utilizado para avaliar o efeito de uma dose mais alta de NPS (NPS 4 mg/kg). A administração prolongada de L-DOPA 20 mg/kg (14 dias) neste grupo provocou o desenvolvimento da discinesia, acometendo a musculatura axial, do membro anterior e orofacial e provocando locomoção circular contralateral ao hemisfério lesionado (dados não apresentados).

Uma única administração de NPS 4 mg/kg no 15º dia, 10 min antes da L-DOPA, reduziu aproximadamente 90% dos movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofaciais contralaterais à lesão. ($U = 2,00$, * $p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA; Figura 19 - A). A análise dos movimentos involuntários anormais axiais,

do membro anterior e orofaciais ao longo dos 140 min observados mostrou efeito geral do tratamento ($F(1,17) = 366,6$, $p < 0,05$), do tempo ($F(6,17) = 7,54$, $p < 0,05$) e interação entre os dois fatores ($F(6,17) = 4,53$, $p < 0,05$; **Figura 19 - B**). Os escores atribuídos para a discinesia axial, do membro anterior e orofacial foram estatisticamente mais baixos em todos os pontos observados ($*p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA).

Com relação ao comportamento rotatório induzido pelo tratamento com L-DOPA, foi observada uma redução de aproximadamente 90% dos escores ($U = 1,00$, $*p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA; **Figura 19 - C**). A análise do comportamento rotatório ao longo dos 140 min mostrou efeito geral do tratamento ($F(1,18) = 160,7$, $p < 0,05$), do tempo ($F(6,18) = 7,66$, $p < 0,05$), e interação entre os dois ($F(6,18) = 4,74$, $p < 0,05$). O comportamento rotatório foi significativamente mais baixo em comparação ao grupo Vei/L-DOPA em todos os pontos analisados ($*p < 0,05$ vs. Grupo Vei/L-DOPA; **Figura 19 - D**).

Figura 17: Efeito da aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre a discinesia já estabelecida pela L-DOPA.

(A) Os movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial e o (B) comportamento rotatório, ambos induzidos pelo tratamento crônico com L-DOPA foram significativamente reduzidos após a aplicação aguda de NPS 4 mg/kg (A; $*p < 0,05$; $n=12$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA, $n=14$); (B; $*p < 0,05$; $n=12$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA, $n=14$). (C) A análise temporal da discinesia axial, do membro anterior e

orofacial e do **(D)** comportamento rotatório revelou redução significativa após aplicação de NPS4 em todos os pontos analisados (* $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA). **A** e **B** (Mann-Whitney). **C** e **D** (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni. **A** e **C** estão representados como valores individuais dos animais (pontos) e mediana (traço). **B** e **D** estão representados como média $\pm$ EPM.

4) OS MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À LID NÃO REFLETEM DE FORMA SIGNIFICATIVA A DIMINUIÇÃO DOS MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS ANORMAIS CAUSADA PELA APLICAÇÃO AGUDA DE NITROPRUSSIATO DE SÓDIO 4 mg/kg

4.1) A aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg não reduziu o número de núcleos marcados positivamente para o fator de transcrição Δ FOS-B na porção dorsal e ventral do estriado lesionado:

Conforme descrito anteriormente, o gene de expressão imediata Δ FOS-B está aumentado no estriado lesionado de roedores após tratamento com L-DOPA (Andersson *et al.*, 1999; Cenci *et al.*, 1999; Pavon *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2010; Padovan-Neto *et al.*, 2011), sendo considerado um marcador molecular clássico para a discinesia. Dessa forma, a expressão de Δ FOS-B pode ser usada como ferramenta para mapear regiões estriatais que estão hiperativadas após tratamento crônico com L-DOPA (Andersson *et al.*, 1999). Resultados do nosso grupo mostraram que uma única aplicação de 7NI bloqueia a discinesia induzida por L-DOPA e inibe a expressão de Δ FOS-B na porção dorsolateral do estriado lesionado (Padovan-Neto *et al.*, 2013; Solís *et al.*, 2015).

Conforme demonstramos, o NPS também reduziu a LID. Com o objetivo de compreender o mecanismo de ação pelo qual o NPS reduz a discinesia e compará-lo ao mecanismo de ação do inibidor da NOS, 7-NI, analisamos a expressão de Δ FOS-B após a aplicação aguda do doador de NO. Para tal, padronizamos a análise para o grupo com maior resposta de diminuição de movimentos involuntários anormais, o grupo tratado com NPS 4 mg/kg.

A análise revelou que houve diferença estatística para o fator tratamento (estriado dorsal: $F(3,48) = 24,10$; estriado ventral: $F(3,48) = 65,71$; $p < 0,05$). Conforme o esperado, nossos resultados mostraram que o tratamento com L-DOPA provocou um aumento dos núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado dorsal e ventral ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal e ventral contralateral à

lesão (* $p < 0,05$; **Figura 20 – A e B**). Embora o grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA tenha apresentado uma tendência a menor expressão dos núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B, essa diferença não foi significativa quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($p > 0,05$ vs. grupo; **Figura 20 – A e 21**).

Figura 18: Efeito da aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre o número de núcleos Δ FOS-B positivos.

(A) Animais tratados cronicamente com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) apresentaram aumento do número de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$; $n=14$). A aplicação aguda de NPS4 não reduziu o número de núcleos Δ FOS-B positivos ($p > 0,05$; $n = 12$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Na porção ventral do estriado ipsilateral à lesão o tratamento crônico com L-DOPA aumentou o número de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B (* $p < 0,05$; $n=14$). A aplicação aguda de NPS4 não reduziu o número de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B ($p > 0,05$; $n=12$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA;). (ANOVA de uma via seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM.

Figura 19: Fotomicrografias representativas da expressão de núcleos Δ FOS-B no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão

O tratamento com L-DOPA aumentou a expressão de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado dorsal (A, A', A'') e ventral. Uma única aplicação de NPS4 não foi capaz de reduzir de forma significativa a expressão de Δ FOS-B no estriado dorsal (B, B', B'') e ventral.

4.2) A aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg tende a reduzir o número de células positivas para COX-2:

A atividade da enzima COX-2 é um componente da cascata inflamatória na periferia (O'Banion, 1999). No cérebro, a enzima COX-2 é constitutiva, expressa e regulada em neurônios pela atividade sináptica (Breder *et al.*, 1995). Evidências sugerem um efeito de *feedback* positivo do NO sobre a atividade e expressão da COX-2 (Iadecola e Gorelick (2005), o que poderia exacerbar o processo neuroinflamatório que ocorre na discinesia.

Desta forma, investigamos se a redução dos escores de discinesia pela droga de ação antagônica ao inibidor da NOS, o NPS seria acompanhada também pela diminuição do número de células COX-2 positivas no estriado lesionado.

A análise revelou que houve diferença estatística para o fator tratamento nas porções dorsal e ventral do estriado (Dorsal: $F(3,44) = 13,02$, $p < 0,05$; Ventral: $F(3,45) = 12,60$, $p < 0,05$). Conforme o esperado, nossos resultados mostraram que o tratamento com L-DOPA aumentou o número de células marcadas positivamente para COX-2 no estriado dorsal e ventral ipsilateral quando comparado ao estriado contralateral à lesão ($*p < 0,05$; **Figura 22 – A e B**). O grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA apresentou uma tendência à diminuição de células COX-2 positivas no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA. No entanto, esta diferença não foi significativa ($p > 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 22 – A**). No estriado ventral, a aplicação aguda de NPS4 reduziu significativamente o número de células marcadas positivamente para COX-2 quando comparado ao estriado ventral ipsilateral à lesão ($\#p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 22 – B e 23**).

Figura 20: Efeito da aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre o número de células COX-2 positivas. (A) O tratamento crônico com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) aumentou significativamente o número de células marcadas positivamente para COX-2 no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$; $n=13$). Não houve redução significativa das células COX-2 positivas após a aplicação aguda de NPS4 ($p > 0,05$; $n=12$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Houve aumento de células COX-2 positivas na porção ventral do estriado ipsilateral quando comparado ao estriado contralateral à lesão (* $p < 0,05$; $n=13$). (B) A aplicação aguda de NPS4 reduziu significativamente o número de células COX-2 positivas (# $p < 0,05$; $n=12$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (ANOVA de uma via seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM.

Figura 21: Fotomicrografias representativas da expressão de células COX-2 no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão.

O tratamento com L-DOPA aumentou o número de células marcadas para COX-2 no estriado dorsal (A, A', A'') e ventral. Embora não tenha sido encontrada diferença estatística, uma única aplicação de NPS4 reduziu o número de células COX-2 no estriado dorsal (B, B', B'').

4.3) A aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg não reduziu a densidade da micróglia marcada com OX-42 no estriado lesionado:

O antígeno CD11b, reconhecido pelo anticorpo OX-42 é expresso na micróglia em repouso e ativada (Ransohoff e Perry, 2009). Nosso objetivo foi de verificar se o doador de NO, NPS, ao atuar reduzindo a LID, atuaria também sobre a expressão da micróglia.

A análise revelou que houve diferença estatística para o fator tratamento nos estriados dorsal e ventral (Dorsal: $F(3,46) = 4,08$; $p < 0,05$; Ventral: $F(3,46) = 8,03$; $p < 0,05$). A expressão de micróglia foi alta tanto no estriado ipsilateral dorsal e ventral quanto no contralateral à lesão em ambos os grupos. Entretanto, a análise pós hoc indicou que o tratamento crônico com L-DOPA aumentou a densidade de micróglia em ambas as porções do estriado ipsilateral quando comparado ao estriado contralateral (dorsal e ventral: $*p < 0,05$; **Figura 24 – A e B**), corroborando os dados de Bortolanza et al. (2015b). Seguindo o padrão dos resultados encontrados anteriormente para $\Delta FOS-B$, a aplicação aguda de NPS 4 mg/kg não reduziu a densidade de micróglia quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA em nenhuma das regiões analisadas ($p > 0,05$; **Figura 24 – A e B; Figura 25**).

Figura 22: Efeito da aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg sobre a densidade da micróglia marcada com OX-42.

(A) Animais tratados cronicamente com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) apresentaram aumento na densidade de micróglia imuno-marcada com OX-42 no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$; $n=14$). A aplicação aguda de NPS4 não modificou a densidade de microglia ($p > 0,05$; $n=11$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Na porção ventral do estriado ipsilateral à lesão o tratamento crônico com L-DOPA aumentou a densidade de micróglia (* $p < 0,05$; $n=14$). A aplicação aguda de NPS4 também não modificou a densidade de micróglia ($p > 0,05$; $n=11$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (ANOVA de uma via seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM.

Figura 23: Fotomicrografias representativas da expressão da micróglia no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão.

O tratamento com L-DOPA aumentou a densidade da micróglia marcada com OX-42 no estriado (A, A', A''). A aplicação aguda de NPS4 não reduziu a densidade da micróglia marcada com OX-42 no estriado dorsal (B, B', B'').

4.4) A aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg não modificou a densidade de astrócitos marcados com GFAP na porção dorsal e ventral do estriado ipsilateral à lesão:

A ativação de astrócitos é acompanhada por um aumento na regulação de GFAP e acompanham mudanças funcionais e moleculares nos astrócitos (Sofroniew, 2009; Sofroniew e Vinters, 2010; Sun e Jakobs, 2012).

Trabalhos do grupo mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA aumenta a expressão de astrócitos marcados com GFAP no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão. O tratamento crônico com 7-NI inibiu esse aumento (Bortolanza e Cavalcanti-Kiwiatkoski *et al.*, 2015). Nós vimos que uma aplicação de NPS reduz a discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA. Nosso objetivo foi verificar se o inibidor e doador apresentam um mecanismo em comum na diminuição da expressão dos astrócitos no estriado lesionado.

A análise revelou que houve diferença estatística para o fator tratamento ($F(3,46) = 5,07$, $p < 0,05$). O tratamento crônico com L-DOPA aumentou a densidade de astrócitos marcados com GFAP na porção dorsal do estriado ipsilateral à lesão quando comparado à porção dorsal do estriado contralateral à lesão ($*p < 0,05$). A aplicação aguda de NPS 4 mg/kg não reduziu a densidade de astrócitos quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($p > 0,05$; **Figura 26 - A**).

Na porção ventral do estriado, a análise revelou que houve diferença estatística para o “fator tratamento” ($F(3,46) = 9,04$, $p < 0,05$). O tratamento crônico com L-DOPA aumentou a densidade de astrócitos na porção ventral ipsilateral do estriado quando comparado à porção ventral contralateral à lesão ($*p < 0,05$). A aplicação aguda de NPS 4 mg/kg não reduziu a densidade de astrócitos quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($p > 0,05$; **Figura 26 – B e 27**).

Figura 24: Efeito da aplicação aguda de Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg sobre a densidade de astrócitos marcados com GFAP.

(A) Animais tratados cronicamente com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) apresentaram aumento na densidade de astrócitos marcados com GFAP no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$; $n=14$). A aplicação aguda de NPS4 não modificou a densidade de astrócitos ($p > 0,05$; $n=11$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Na porção ventral do estriado ipsilateral à lesão o tratamento crônico com L-DOPA aumentou a densidade de astrócitos quando comparado ao estriado contralateral à lesão (* $p < 0,05$; $n=14$). A aplicação aguda de NPS4 não modificou a densidade de astrócitos nesta porção do estriado ($p > 0,05$; $n=11$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (ANOVA de uma via seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM.

Figura 25: Fotomicrografias representativas da expressão de astrócitos no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão.

O tratamento com L-DOPA aumentou a densidade de astrócitos no estriado (A, A', A''). Uma única aplicação de NPS4 não reduziu a densidade de astrócitos no estriado dorsal (B, B', B'').

5) O TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (2 e 4 mg/kg) REDUZIU O DESENVOLVIMENTO E EXPRESSÃO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA.

A redução da discinesia induzida por L-DOPA causada por uma única aplicação de NPS 4 mg/kg não foi acompanhada pela redução significativa de Δ FOS-B e de fatores inflamatórios associados à discinesia (COX-2, OX-42 e GFAP). Entretanto, é possível que uma única aplicação de NPS não tenha sido capaz de modificar a expressão dos fatores analisados. Investigamos se o tratamento crônico com o NPS, nas doses de 2 e 4 mg/kg, durante o desenvolvimento da discinesia seria capaz de reduzir o desenvolvimento da discinesia e impedir o aumento da expressão desses marcadores.

No primeiro experimento, animais hemi-parkinsonianos foram divididos em dois subgrupos experimentais (grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA, n=8; e grupo 6-OHDA/NPS2/L-DOPA, n=8). Durante 14 dias os animais foram tratados cronicamente com Vei/L-DOPA e/ou NPS2/L-DOPA.

A análise estatística revelou que houve efeito geral para o fator tempo ($F(2, 36) = 6,05$, $p < 0,05$) e fator tratamento ($F(1, 36) = 8,83$, $p < 0,05$), sem interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(2, 36) = 0,69$, $p > 0,05$). O tratamento crônico com L-DOPA induziu o surgimento de movimentos involuntários anormais no grupo tratado com veículo. Embora sem diferença estatística, os escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial foram visivelmente mais baixos no grupo 6-OHDA/NPS2/L-DOPA ($p > 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 28 - A**).

O tratamento crônico com L-DOPA também induziu o surgimento de movimentos circulares contralaterais à lesão. A análise estatística revelou que houve efeito geral para o fator tratamento ($F(1, 36) = 26,00$, $p < 0,05$), sem efeito para o fator tempo ($F(2, 36) = 2,22$, $p > 0,05$) e nenhuma interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(2, 36) = 1,59$, $p > 0,05$). Os escores aplicados para o comportamento rotatório foram mais baixos em todos os dias analisadas para o grupo tratado cronicamente com NPS2, mas com diferença estatística somente no dia 7 de tratamento ($*p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 28 - B**).

Na análise temporal da discinesia do membro anterior, axial e orofacial ao longo de 140 min, foi demonstrado que houve efeito geral para o fator tempo ($F(6, 84) = 3,08$,

$p < 0,05$), fator tratamento ($F(1,84) = 23,87$, $p < 0,05$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(6, 84) = 4,23$, $p < 0,05$). Os escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais foram mais baixos no grupo tratado cronicamente com NPS2 em todos os pontos analisados, mas com diferença estatística somente nos 20, 40 e 80 min (* $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 28 - C**).

Na análise da curva temporal de 140 min da rotação contralateral à lesão induzida pela L-DOPA, os escores atribuídos foram menores em todos os pontos analisados para o grupo NPS2/L-DOPA quando comparado ao controle, com diferença estatística nos tempos de 20 e 40 min (* $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 28 - D**).

Os animais tratados cronicamente com NPS 2 mg/kg foram submetidos ao teste de caminhada para avaliar se houve interferência do tratamento com NPS no efeito benéfico da L-DOPA sobre o prejuízo motor induzido pela lesão com 6-OHDA. Os animais também foram submetidos ao teste de campo aberto para avaliar se a atividade locomotora do animal estava comprometida pelo tratamento com NPS. O teste de caminhada realizado no dia 1 mostrou que uma única aplicação de NPS2 não interferiu com o efeito benéfico da L-DOPA (Dia 1; $X^2: 2,62$, $p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). No 14º dia os animais foram novamente submetidos ao teste de caminhada e observamos que o tratamento crônico com NPS2 mais uma vez não prejudicou o efeito benéfico da L-DOPA (Dia 14; $X^2: 2,62$, $p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 28 - E**).

No teste do campo aberto, a análise estatística revelou efeito para o fator tratamento ($F(3,24) = 3,06$, $p < 0,05$). A análise estatística mostrou que uma única aplicação de NPS2 (Dia 1; $p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA) ou a aplicação crônica de 14 dias não interferiu na atividade locomotora dos animais (Dia 14; $p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 28 - F**).

Figura 26: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (2 mg/kg, i.p.) sobre a o desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA.

(A) Escores atribuídos para a discinesia axial, do membro anterior e orofacial nos dias 1, 7 e 14 do tratamento com Vei/L-DOPA e/ou NPS2/L-DOPA ($p > 0,05$). (B) Houve redução significativa dos escores atribuídos para a discinesia locomotora no 7º dia de tratamento com NPS2 mg/kg em relação ao grupo tratado com Vei/L-DOPA; ($*p < 0,05$). (C) No 14º dia da análise temporal, os escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais axial, do membro anterior e orofaciais dos animais tratados cronicamente com NPS2/L-DOPA foram significativamente mais baixos nos 20, 40 e 80 min analisados em relação ao grupo tratado com Vei/L-DOPA ($*p < 0,05$). (D) No 14º dia da análise temporal, os escores atribuídos para a discinesia locomotora foram significativamente mais baixos no grupo tratado cronicamente com NPS2/L-DOPA, nos 20 e 40 min analisados em comparação ao grupo tratado com Vei/L-DOPA ($*p < 0,05$). (E) Uma única aplicação (Dia 1) ou várias aplicações (Dia 14) de NPS2 não

interferiram com o efeito benéfico da L-DOPA no teste de caminhada ($p > 0,05$) ou com a (F) atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto. A, B, C e D (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). E (Kruskal-Wallis). F (ANOVA de uma via). Dados representam média $\pm$ EPM. $n = 8/\text{grupo}$.

Um grupo independente de ratos hemi-parkinsonianos foi dividido em quatro subgrupos experimentais para avaliar a dose mais alta de NPS (grupo 6-OHDA/Vei/SAL, $n=6$; grupo 6-OHDA/NPS4/SAL, $n=6$; grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA, $n=8$; e grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA, $n=8$). Durante 14 dias os animais foram tratados cronicamente com L-DOPA e/ou NPS4 e/ou SAL.

A análise estatística revelou efeito geral para o fator tempo ($F(2, 42) = 8,53$, $p < 0,05$) e fator tratamento ($F(1,42) = 54,74$, $p < 0,05$), com interação entre os fatores ($F(2, 42) = 3,93$, $p < 0,05$). O tratamento crônico com L-DOPA induziu o surgimento de movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial contralateral à lesão a partir do primeiro dia de tratamento. O tratamento crônico com NPS4, por sua vez, reduziu significativamente o desenvolvimento e expressão dos movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial em todos os dias analisados ($*p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 29 – A**).

O tratamento crônico com L-DOPA também induziu o surgimento de movimentos circulares contralaterais à lesão. A análise estatística revelou efeito geral para o fator tempo ($F(2, 42) = 11,35$, $p < 0,05$) e fator tratamento ($F(1,42) = 48,64$, $p < 0,05$), com interação entre os fatores ($F(2, 42) = 6,74$, $p < 0,05$). O tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente o desenvolvimento e expressão do comportamento rotatório nos dias 7 e 14 de tratamento ($*p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 29 – B**).

A análise estatística dos escores atribuídos para a discinesia axial, do membro anterior e orofacial ao longo do tempo (análise da curva temporal) mostrou que houve efeito geral para o fator tempo ($F(2, 42) = 8,53$, $p < 0,05$), fator tratamento ($F(1,42) = 54,74$, $p < 0,05$) e interação entre os dois ($F(2, 42) = 3,93$, $p < 0,05$). Os escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofaciais foram significativamente mais baixos no grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA em todos os pontos analisados ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 29 – C**).

A análise estatística dos escores atribuídos para a rotação contralateral à lesão ao longo do tempo também mostrou efeito geral para o fator tratamento ($F(1, 98) = 163.8$, $p < 0,05$), mas sem efeito para o fator tempo ($F(6,98) = 0,25$, $p > 0,05$) e nenhuma interação entre os fatores ($F(6, 98) = 1,22$, $p > 0,05$). Os escores atribuídos para o comportamento rotatório foram significativamente mais baixos no grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA em todos os pontos analisados ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 29 – D**).

Os animais foram submetidos ao teste de caminhada e ao campo aberto nos dias 1 e 14 do tratamento com Vei/L-DOPA e/ou NPS4/L-DOPA. Para o teste de caminhada, a análise estatística mostrou que houve efeito geral para o fator tempo ($F(2, 42) = 3.55$, $p < 0,05$), fator tratamento ($F(1,42) = 9,87$, $p < 0,05$), sem interação entre os fatores tempo e tratamento ($F(2, 42) = 0,58$, $p > 0,05$). O teste pós hoc mostrou que a aplicação aguda (dia 1) ou o tratamento subcrônico (7 dias; dados não apresentados) com NPS4 não interferi com o efeito benéfico da L-DOPA ($p > 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA). No entanto, o tratamento crônico com NPS4 (14 dias) prejudicou a performance dos animais no teste de caminhada (* $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 29 – E**). No teste do campo aberto, a análise estatística revelou que não houve efeito para o fator tratamento ($F(3,28) = 0,14$, $p > 0,05$). Uma única aplicação ou o tratamento crônico com NPS4 não interferiu com a atividade locomotora dos animais (dia 1 e dia 14; $p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 29 – F**).

Figura 27: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre o desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA. (A) O tratamento crônico com NPS4/L-DOPA reduziu significativamente o desenvolvimento e expressão da discinesia axial, do membro anterior, orofacial (B) e o comportamento rotatório ao longo dos 14 dias de tratamento (* $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (C) A análise temporal mostrou que houve redução significativa da discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (D) rotação ao longo dos 140 min observados (* $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (E) O tratamento crônico com NPS4/L-DOPA (dia 14) interferiu com o efeito benéfico da L-DOPA no teste de caminhada (* $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (F) Uma única aplicação ou o tratamento crônico com NPS4 não interferiu com a atividade locomotora dos animais no teste do campo aberto ($p > 0,05$). A, B, C, D e E (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). F (ANOVA de uma via). Dados representam média $\pm$ EPM. $n = 8/\text{grupo}$.

6) EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 mg/kg) SOBRE OS MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS A DISCINESIA: Δ FOS-B, COX-2, OX-42 E GFAP NO ESTRIADO IPSILATERAL À LESÃO.

6.1) O tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg não modificou o número de núcleos positivos para Δ FOS-B na porção dorsal e ventral do estriado ipsilateral à lesão:

Demonstramos anteriormente que uma única aplicação de NPS4 mg/kg não reduziu a expressão de Δ FOS-B no estriado dorsal e ventral de animais discinéticos. Posteriormente, verificamos se o tratamento crônico com NPS4 durante o desenvolvimento da discinesia seria capaz de impedir a ativação de Δ FOS-B no estriado lesionado dos animais.

Nas porções dorsal e ventral do estriado, a análise revelou efeito para o fator tratamento (Dorsal: $F(3,46) = 11,40$, $p < 0,05$. Ventral: $F(3,46) = 13,63$, $p < 0,05$), para o fator lado (Dorsal: $F(1,46) = 174,2$, $p < 0,05$; Ventral: $F(1,46) = 179,3$, $p < 0,05$) e uma interação entre os fatores (Dorsal: $F(3,46) = 6,91$, $p < 0,05$. Ventral: $F(3,46) = 7,90$, $p < 0,05$). O tratamento com L-DOPA provocou um aumento dos núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado lesionado quando comparado ao lado contralateral ($*p < 0,05$; **Figura 30 - A**) e aos grupos tratados com salina ($\#p < 0,05$). O tratamento crônico com NPS4 não reduziu o número de núcleos Δ FOS-B positivos quando comparado ao estriado dorsal ipsilateral à lesão do grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($p > 0,05$; **Figura 30 – B e 31**).

Figura 28: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre o número de núcleos Δ FOS-B positivos.

(A) Animais tratados cronicamente com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) apresentaram aumento do número de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$). O tratamento crônico com NPS4 não reduziu o número de núcleos Δ FOS-B positivos ($p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Na porção ventral do estriado ipsilateral à lesão o tratamento crônico com L-DOPA aumentou o número de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B (* $p < 0,05$). O tratamento crônico com NPS4 não reduziu o número de núcleos Δ FOS-B positivos ($p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM. $n = 5-8$ /grupo.

Figura 29: Fotomicrografias representativas da expressão de núcleos Δ FOS-B positivos no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão.

O tratamento com L-DOPA aumentou o número de núcleos Δ FOS-B positivos no estriado (A, A', A''). O tratamento crônico com NPS4 não impediu o aumento de núcleos positivos para Δ FOS-B no estriado dorsal (B, B', B'').

6.2) O tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg reduziu o número de células marcadas positivamente para COX-2 na porção ventral do estriado ipsilateral à lesão:

Nosso grupo descreveu anteriormente que o tratamento com 7-Ni30/L-DOPA durante o desenvolvimento da discinesia reduz a expressão de COX-2 no estriado dorsal lesionado (Bortolanza *et al.*, 2015). Neste trabalho, demonstramos que uma única aplicação de NPS4 tendeu a diminuir o número de células positivas para COX-2 no estriado dorsal de ratos discinéticos e diminuiu o número dessas células na porção ventral do estriado. Dessa forma, nosso objetivo foi verificar se o tratamento prolongado com NPS4/L-DOPA durante o desenvolvimento da discinesia seria capaz de reduzir o número de células COX-2 positivas no estriado.

Na porção dorsal do estriado, a análise revelou efeito para o fator tratamento ($F(1,48) = 29,15$, $p < 0,05$). Não houve efeito para o fator lado ($F(3,78) = 1,71$, $p > 0,05$) e não houve interação entre os fatores ($F(3,48) = 1,63$, $p > 0,05$). O tratamento com L-DOPA provocou um aumento das células marcadas positivamente para COX-2 no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$; **Figura 32 - A**). Embora não tenha sido estatisticamente diferente, houve uma tendência à redução das células COX-2 positivas no estriado dorsal ipsilateral à lesão no grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($p > 0,05$; **Figura 32 - A**).

Na porção ventral do estriado, a análise revelou efeito para o fator tratamento ($F(1,48) = 11,54$, $p < 0,05$), para o fator lado ($F(3,48) = 4,00$, $p < 0,05$) e uma interação entre os fatores tratamento e lado ($F(3,48) = 3,88$, $p < 0,05$). O tratamento com L-DOPA mais uma vez provocou um aumento das células marcadas positivamente para COX-2 no estriado ventral ipsilateral quando comparado ao estriado ventral contralateral à lesão (* $p < 0,05$; **Figura 32 - B**). Nesta porção, o tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente as células COX-2 positivas no estriado ventral ipsilateral quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 32 - B e 33**).

Figura 30: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre o número de células COX-2 positivas.

(A) Animais tratados cronicamente com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) apresentaram aumento do número de células COX-2 positivas no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$). (A) O tratamento crônico com NPS4 não reduziu o número de células COX-2 positivas ($p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Na porção ventral do estriado ipsilateral à lesão o tratamento crônico com L-DOPA aumentou o número de células COX-2 positivas com relação ao estriado ventral contralateral (* $p < 0,05$). (B) Nesta porção do estriado, o tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente o número de células COX-2 positivas (# $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM. $n = 5-8$ /grupo.

Figura 31: Fotomicrografias representativas da expressão das células COX-2 positivas no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão.

O tratamento com L-DOPA aumentou o número de células COX-2 positivas no estriado (A, A', A''). O tratamento crônico com NPS4 impediu o aumento de células COX-2 no estriado dorsal (B, B', B'').

6.3) O tratamento crônico com L-DOPA e/ou NPS4 não modificou a expressão da micrógliia marcada com OX-42 no estriado lesionado:

O tratamento crônico com 7-NI30 durante o desenvolvimento da discinesia reduz significativamente a expressão de astrócitos e micrógliia no estriado lesionado, conforme descrito por nosso grupo (Bortolanza *et al.*, 2015). Desta forma, verificamos se o NPS sob o mesmo desenho experimental teria ação similar à do 7NI.

A expressão de OX-42, marcador de micrógliia em repouso e ativada, se apresentou alta em todos os grupos e em todas as porções analisadas. Para a porção dorsal do estriado, a análise estatística revelou efeito para o fator tratamento ($F(3,46) = 4,02$, $p < 0,05$), para o fator lado ($F(1,46) = 3,95$, $p < 0,05$), sem interação entre os dois fatores ($F(3,46) = 0,35$, $p > 0,05$; **Figura 34 - A**). Para a porção ventral do estriado, a análise estatística revelou efeito apenas para o fator lado ($F(1,46) = 19,37$, $p < 0,05$). Não houve efeito para o fator tratamento ($F(3,46) = 1,47$, $p > 0,05$), e nenhuma interação entre os dois fatores ($F(3,46) = 0,40$, $p > 0,05$; **Figura 34 - B**).

O tratamento crônico com L-DOPA e o tratamento crônico com NPS4/L-DOPA não modificaram a expressão da micrógliia imuno-marcada com OX-42 na porção dorsal ou ventral do estriado ($p > 0,05$; **Figura 34 – A e B, Figura 35**).

Figura 32: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre a expressão da micrógliia no estriado ipsilateral à lesão.

(A) O tratamento crônico com L-DOPA e/ou NPS4/L-DOPA não alterou a expressão da micrógliia no estriado dorsal e (B) ventral ipsilateral à lesão. (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM. $n = 5-8$ /grupo.

Figura 33: Fotomicrografias representativas da expressão da micróglia no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão.

O tratamento com L-DOPA não modificou a expressão da micróglia no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão (A, A', A'') quando comparado ao estriado contralateral. O tratamento crônico com NPS4/L-DOPA não modificou a expressão da micróglia no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão (B, B', B'') quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA.

6.4) O tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio 4 mg/kg reduziu a expressão dos astrócitos marcados com GFAP na porção dorsal e ventral do estriado ipsilateral à lesão:

Para a porção dorsal do estriado, a análise revelou diferença estatística para o fator tratamento ($F(3,40) = 7,64, p < 0,05$), para o fator lado ($F(1,40) = 28,87, p < 0,05$), sem interação entre os dois fatores ($F(3,40) = 1,09, p > 0,05$). Para a porção ventral do estriado, a análise revelou diferença estatística para o fator tratamento ($F(3,42) = 3,13, p < 0,05$), para o fator lado ($F(1,42) = 52,87, p < 0,05$) com interação entre os dois fatores ($F(3,42) = 2,97, p < 0,05$). Diferentemente do encontrado para a micróglia, o tratamento crônico com L-DOPA aumentou a expressão dos astrócitos na porção dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado contralateral à lesão (* $p < 0,05$, **Figura 36 – A**). Surpreendentemente, o tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente a expressão dos astrócitos no estriado dorsal e ventral ipsilateral quando comparado ao estriado ipsilateral à lesão (# $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA, **Figura 36 – B e 37**).

Figura 34: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre a expressão de astrócitos no estriado ipsilateral à lesão.

(A) O tratamento crônico com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) aumentou a expressão dos astrócitos no estriado dorsal ipsilateral quando comparado ao estriado dorsal contralateral à lesão (* $p < 0,05$). O tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente a expressão de astrócitos no estriado ipsilateral à lesão quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA (# $p < 0,05$). (B) Na porção ventral do estriado, o tratamento crônico com L-DOPA (20 mg/kg, gavagem) aumentou significativamente a expressão dos astrócitos no estriado ipsilateral quando comparado ao estriado contralateral à lesão (* $p < 0,05$). Nesta porção do estriado, o tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente a expressão de astrócitos no estriado ipsilateral quando comparado ao estriado ipsilateral à lesão do grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA (# $p < 0,05$). (ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni). Dados representam média $\pm$ EPM. $n = 5-8$ /grupo.

Figura 35: Fotomicrografias representativas da expressão de astrócitos no estriado dorsolateral, ipsilateral à lesão de ratos tratados cronicamente com L-DOPA (A, A', A'') e ratos tratados cronicamente com NPS4/L-DOPA (B, B', B'').

O tratamento crônico com NPS4 reduziu significativamente a densidade dos astrócitos marcados com GFAP no estriado.

7) EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSIATO DE SÓDIO (4 mg/kg) E/OU 7-NITROINDAZOL (30 mg/kg) SOBRE OS NÍVEIS DE NITRITO NA PORÇÃO DORSOLATERAL DO ESTRIADO IPSILATERAL À LESÃO.

Conforme demonstrado, o tratamento crônico com o NPS apresentou atenuou o surgimento da discinesia e esse efeito foi observado ao longo de todo período de quantificação (20 – 140 min). Entretanto, o NPS possui uma meia vida curta (4 min; Kreye e Reske, 1982); desta forma, seria possível que o efeito anti-discinético produzido pelo NPS não fosse consequência direta do aumento de NO no estriado lesionado, mas talvez de forma indireta, através de um mecanismo alternativo pelo qual ele estaria agindo. Para confirmar se a ação anti-discinética do NPS estaria relacionada ao aumento de NO no estriado, medimos as concentrações teciduais de nitrito, principal metabólito do NO no estriado dorsolateral de ratos discinéticos (grupo Vei/L-DOPA) e de ratos tratados cronicamente com NPS4/L-DOPA e/ou 7NI30/L-DOPA.

O tratamento crônico com NPS reduziu significativamente o desenvolvimento da discinesia axial, do membro anterior e orofacial quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($X^2 = 13,52$, $*p < 0,05$; **Figura 38 - A**). Os animais que foram tratados cronicamente com 7-NI não desenvolveram movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofacial quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($X^2 = 13,52$, $*p < 0,05$; **Figura 38 - A**). Embora não tenha sido encontrada diferença estatística, os escores aplicados para o comportamento rotatório dos animais tratados cronicamente com NPS e/ou 7-NI foram significativamente mais baixos quando comparados ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($X^2 = 2,97$, $p > 0,05$; **Figura 38 - B**).

Com relação aos níveis de nitrito, a análise estatística revelou efeito para o “fator tratamento” ($F(3, 22) = 4,66$, $p < 0,05$). Embora não tenha sido encontrada diferença estatística, o tratamento crônico com L-DOPA aumentou consideravelmente os níveis de nitrito no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de animais discinéticos ($p > 0,05$ vs. grupo SHAM; **Figura 38 - C**). O tratamento crônico com NPS4 aumentou significativamente os níveis de nitrito no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão ($*p <$

0,05 vs. grupo SHAM; **Figura 38 – C**), evidenciando que, mesmo com uma meia-vida curta, o NPS é capaz de aumentar os níveis de NO e de seu metabólito nitrito no estriado lesionado. Assim, é possível associar o aumento de NO no estriado a sua ação anti-discinética. O tratamento crônico com 7NI30/L-DOPA não modificou o aumento dos níveis de nitrito causado pela L-DOPA ($\#p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/NPS4/L-DOPA; **Figura 38 - C**).

Figura 36: Efeito do tratamento crônico com Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) ou 7-Nitroindazol (30 mg/kg, i.p.) sobre as concentrações teciduais de nitrito no estriado dorsolateral à lesão de ratos hemi-parkinsonianos.

(A) O tratamento crônico com NPS4 e/ou 7-Ni30 preveniu/bloqueou o desenvolvimento da discinesia axial, do membro anterior e orofacial ($*p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (B) Ratos tratados cronicamente com NPS4 e/ou 7-Ni30 apresentaram redução do comportamento rotatório ($p > 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA) (C) Ratos tratados cronicamente com NPS4/L-DOPA apresentaram aumento significativo de nitrito no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão ($*p < 0,05$ vs. SHAM). (C) O tratamento crônico com 7NI30/L-DOPA preveniu o

aumento dos níveis de nitrito no estriado dorsolateral de ratos hemi-parkinsonianos (#p < 0,05 vs. 6-OHDA/NPS4/L-DOPA). Valores ($\mu\text{mol/L}$) apresentados em forma de média $\pm$ EPM). (Anova de uma via seguido de Bonferroni). n = 7-8/grupo.

8) O TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 mg/kg) OU 7-NITROINDAZOL (30 mg/kg) IMPEDIU O AUMENTO DOS NÍVEIS DE AMPC NA PORÇÃO DORSOLATERAL DO ESTRIADO IPSILATERAL À LESÃO.

Conforme demonstramos anteriormente, os níveis de NO estão aumentados no estriado lesionado após o tratamento com NPS + L-DOPA, visto de forma indireta através da medida de nitrito tecidual. Por outro lado, as medidas de nitrito apresentaram níveis similares ao do grupo sham no grupo tratado cronicamente com 7-NI + L-DOPA, indicando que, por mais que ambas as drogas tenham ação anti-discinética, não possuem como mecanismo comum o aumento dos níveis de NO estriatal. De forma similar, essas drogas não compartilham como mecanismo de ação a redução de fatores moleculares associados à discinesia como o $\Delta\text{FOS-B}$ e os marcadores inflamatórios COX-2, micróglia e astrócitos (uma vez que o NPS foi pouco efetivo em reduzir esses fatores, enquanto o 7-NI reduz de forma robusta todos os fatores analisados). Sendo assim, ainda não está claro qual seria o mecanismo em comum entre as duas drogas que resultam na diminuição da discinesia.

Issy *et al.*, 2018 mostraram que a aplicação aguda de NPS (2,5 mg/kg) e de 7NI (1 e 3 mg/kg) reverteu o prejuízo induzido pela anfetamina no teste de inibição pré pulso, convergindo em uma ação benéfica comum similar à encontrada neste trabalho. Os autores associaram essa reversão do prejuízo induzido pela anfetamina a um mecanismo comum das duas drogas que consiste na diminuição dos níveis de AMPc em diferentes estruturas encefálicas, inclusive no estriado.

Há um consenso de que a discinesia induzida por L-DOPA é resultado da hiperestimulação da via de sinalização D1/AC/AMPc. Sendo assim, seguimos com o objetivo de confirmar se, no nosso modelo, a modulação dos níveis de AMPc poderia ser um mecanismo comum entre as duas drogas. Para tal, medimos os níveis de AMPc e GMPc no estriado dorsolateral lesionado de ratos tratados cronicamente com L-DOPA, NPS4 e/ou 7NI30.

Na análise da discinesia axial, do membro anterior e orofacial, houve um efeito geral sobre o fator tratamento ($F(2, 147) = 64,72, p < 0,05$), sobre o fator tempo ($F(6, 147) = 2,77, p < 0,05$) e interação entre os dois fatores ($F(12, 147) = 3,90, p < 0,05$). O tratamento crônico com L-DOPA induziu o surgimento de movimentos involuntários anormais que acometeram a musculatura axial, do membro anterior e orofacial. Os escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofaciais atingiram um pico nos 60 min e começaram a diminuir nos 120 min. O tratamento crônico com 7-NI bloqueou o surgimento da discinesia axial, do membro anterior e orofacial ($\#p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA; figura x-x). Os escores atribuídos para o grupo tratado cronicamente com NPS foram significativamente mais baixos quando comparados ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA em todos os tempos analisados, com exceção dos 20 e 40 min ($*p < 0,05$; **Figura 39 - A**).

Na análise do comportamento rotatório, houve um efeito geral sobre o fator tratamento ($F(2, 147) = 46,07, p < 0,05$). Não houve efeito sobre o fator tempo ($F(6, 147) = 1,84, p < 0,05$), porém, houve interação entre os dois ($F(12, 147) = 2,58, p < 0,05$). O tratamento crônico com L-DOPA induziu o surgimento de movimentos circulares contralaterais à lesão. Os escores atribuídos para o comportamento rotatório atingiram um pico nos 80 e 100 min e começaram a diminuir nos 120 min. O tratamento crônico com 7-NI bloqueou o surgimento do comportamento rotatório quando comparado ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($\#p < 0,05$; **Figura 39 - B**). Animais tratados cronicamente com NPS, por sua vez, apresentaram redução significativa dos escores aplicados para o comportamento rotatório. Os escores foram significativamente mais baixos dos 60 aos 120 min quando comparados ao grupo 6-OHDA/Vei/L-DOPA ($*p < 0,05$; **Figura 39 - B**).

Na análise de AMPc, observamos um efeito geral sobre o fator “moduladores nitrérgicos” ($F(2, 30) = 21,00, p < 0,05$), sobre o fator L-DOPA ($F(1, 30) = 15,98, p < 0,05$) e houve interação entre os fatores “moduladores nitrérgicos e L-DOPA” ($F(2, 30) = 5,83, p < 0,05$). A análise pós-hoc mostrou que o tratamento crônico com L-DOPA aumentou significativamente os níveis de AMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos discinéticos ($*p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/SAL; **Figura 39 - C**). O tratamento crônico com NPS4/L-DOPA durante o desenvolvimento da discinesia preveniu aproximadamente 60% a elevação dos níveis de AMPc no estriado dorsolateral lesionado ($\#p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 39 - C**). O tratamento crônico

com 7NI30/L-DOPA durante o desenvolvimento da discinesia também preveniu a elevação dos níveis de AMPc (aproximadamente 40%) no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão ($\#p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 39 - C**).

Na análise de GMPc, por sua vez, houve efeito geral sobre o fator “moduladores nitrérgicos” ($F(2, 30) = 36,84, p < 0,05$), sobre “L-DOPA” ($F(1, 30) = 17,72, p < 0,05$) e nenhuma interação entre os fatores ($F(2, 30) = 2,04, p > 0,05$). A análise pós-hoc mostrou que o tratamento crônico com L-DOPA aumentou significativamente os níveis de GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos discinéticos ($*p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/SAL; **Figura 39 - D**). Como esperado, o tratamento crônico com 7NI30/L-DOPA preveniu o aumento dos níveis de GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão ($\#p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 39 - D**). Embora não tenha sido encontrada diferença estatística, o tratamento crônico com NPS4/L-DOPA elevou consideravelmente os níveis de GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão em comparação ao grupo L-DOPA ($p > 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; **Figura 39 - D**). É importante ressaltar que o 7NI e o NPS quando aplicados sozinhos (sem estarem associados ao tratamento com L-DOPA) também modularam os níveis de AMPc e GMPc. Isso indica que essas drogas possuem esse mecanismo *per se* e não somente quando associadas ao tratamento com L-DOPA.

Figura 37: Efeito do tratamento crônico com 7-Nitroindazol (30 mg/kg, i.p.) ou Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre os níveis de AMPc e GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos hemi-parkinsonianos.

(A) O tratamento crônico com 7-Ni30 e NPS4 bloqueou/atenuou o surgimento da discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (B) da rotação induzida por L-DOPA (7-Ni30: # $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA; NPS4: * $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA). (C) O tratamento crônico com L-DOPA aumentou os níveis de AMPc no estriado dorsolateral de ratos hemi-parkinsonianos (* $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/SAL). O tratamento crônico com 7-Ni30 e NPS4 preveniu o aumento dos níveis de AMPc em 40% (7-Ni30: # $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA) e 60% (NPS4: # $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA), aproximadamente. (D) O tratamento crônico com L-DOPA aumentou os níveis de GMPc (* $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/SAL), enquanto que o tratamento crônico com 7NI30 preveniu esse aumento (# $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA) e o tratamento crônico com NPS4 aumentou significativamente os níveis do nucleotídeo cíclico no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos hemi-parkinsonianos (# $p < 0,05$ vs. 6-OHDA/Vei/L-DOPA). Valores (pmol/mg) apresentados em forma de média $\pm$ EPM). A, B, C e D (Anova de duas vias seguido de Bonferroni). $n = 6$ /grupo.

9) O TRATAMENTO CRÔNICO COM NITROPRUSSATO DE SÓDIO (4 mg/kg) OU 7-NITROINDAZOL (30 mg/kg) ATENUOU A EXPRESSÃO DA

PROTEÍNA p-CREB NA PORÇÃO DORSOLATERAL DO ESTRIADO IPSILATERAL À LESÃO.

A prolongada administração de L-DOPA aumenta a fosforilação de CREB em neurônios estriatais, e o aumento da fosforilação desta proteína está associado com a manifestação da discinesia induzida por L-DOPA (Oh *et al.*, 2003). Uma vez que a fosforilação de CREB é diretamente dependente de AMPc e nossos resultados mostraram que o tratamento com NPS4 e 7-Ni30, ao diminuir a discinesia, também impede o aumento de AMPc, fomos verificar se a expressão da proteína CREB fosforilada também estaria diminuída no estriado dorsolateral lesionado de animais tratados cronicamente com NPS4/L-DOPA e/ou 7-Ni30/L-DOPA.

Houve efeito geral para o fator tratamento ($F(2, 6) = 11,26$, $p < 0,05$). A análise pós hoc mostrou que o tratamento crônico com 7-NI30 ou NPS4 durante o desenvolvimento da discinesia impediu o aumento da expressão da versão fosforilada de pCREB ($+p < 0,1$ vs. grupo Vei/L-DOPA; **Figura 40**).

Figura 38: Efeito do tratamento crônico com 7-Nitroindazol (30 mg/kg, i.p.) ou Nitroprussiato de Sódio (4 mg/kg, i.p.) sobre a expressão da proteína p-CREB no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos hemi-parkinsonianos.

O tratamento crônico com NPS4 ou 7-NI30 juntamente com L-DOPA reduziu significativamente a expressão da proteína pCREB no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos hemi-parkinsonianos ($+p < 0,1$ vs. Vei/L-DOPA). A diminuição causada pelo 7-NI30 foi maior quando comparada ao NPS4 (apesar de não serem estatisticamente diferentes). Valores (U.A.) apresentados em forma de média $\pm$ EPM). (Anova de uma via seguido de Bonferroni). $n = 3/\text{grupo}$.

10) A APLICAÇÃO INTRAESTRIATAL SUBCRÔNICA DE ZAPRINASTE, DROGA QUE INIBE AS FOSFODIESTERASES 5, 6 E 9, REDUZ A DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA.

Nossos resultados demonstraram que a inibição da via de sinalização NO/GCs/GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos discinéticos pode estar envolvida com a diminuição da discinesia induzida por L-DOPA utilizando mecanismos indiretos (como a diminuição de AMPc). Sendo assim, torna-se fundamental demonstrar que não somente o AMPc, mas também o GMPc pode ser responsável pela diminuição da discinesia. Animais discinéticos tiveram uma cânula inserida no estriado dorsal ipsilateral à lesão e foram desafiados com uma única aplicação de Zaprinate (300 μM), inibidor das fosfodiesterases 5, 6 e 9 (Piconi *et al.*, 2011), durante 5 dias.

No estriado, a fosfodiesterase 9 é amplamente expressa (para revisão ver Domek-Lopacinska e Strosznajder, 2005; Bender e Beavo, 2006), e sua inibição resulta em aumento dos níveis intracelulares de GMPc. Embora a expressão da fosfodiesterase 5 no estriado seja muito baixa, há evidências (Domek-Lopacinska e Strosznajder, 2008; Giorgi *et al.*, 2008; Puerta *et al.*, 2009; Solís *et al.*, 2015) que em *in vivo*, a administração de sildenafil e zaprinaste aumenta os níveis de GMPc e afeta o comportamento motor, sugerindo que este nucleotídeo cíclico pode ser modificado no estriado.

Nossos resultados corroboram os resultados encontrados por Picconi *et al.*, (2011). Demonstramos que no primeiro dia de microinjeção houve uma tendência de redução dos escores aplicados para os movimentos involuntários anormais quando comparados aos escores aplicados no dia anterior a microinjeção (pré-microinjeção; Vei/L-DOPA). No último dia de microinjeção (5º dia), os escores foram

significativamente mais baixos quando comparados à pré-microinjeção ($x^2 = 7,68$; $*p < 0,05$; **Figura 41 -A**). Da mesma forma, os escores aplicados para o comportamento rotatório no 4º dia de aplicação foram significativamente mais baixos quando comparados à pré-microinjeção ($x^2 = 7,68$; $*p < 0,05$; **Figura 41 - B**).

Ao final dos experimentos, as cânulas foram confirmadas no estriado dorsal entre $-0,26$ e $-0,30$ anterior ao bregma (Paxinos e Watson, 1997 – **Figura 44**).

Figura 39: Efeito da aplicação intraestriatal de zaprinaste sobre a discinesia induzida por L-DOPA.

(A) Os escores aplicados para a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (B) para o comportamento rotatório foram significativamente mais baixos no 5º dia da microinjeção de zaprinaste 300 µM ($*p < 0,05$ vs. Pré microinjeção). E e F (Friedman). Valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (traço). $n = 5$.

DISCUSSÃO

O modelo animal da discinesia induzida por L-DOPA em roedores é utilizado com sucesso, uma vez que, comprovadamente oferece um modelo válido de discinesia, pois respondem a tratamentos antidiscinéticos eficazes em pacientes com doença de Parkinson e em modelos da discinesia induzida por L-DOPA em primatas não humanos (Lundblad *et al.*, 2002). Além disso, os movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofaciais não foram induzidos em nenhuma extensão significativa por tratamentos antiparkinsonianos com baixo potencial de indução de discinesia em pacientes (Lundblad *et al.*, 2002; Lundblad *et al.*, 2003). Por outro lado, os escores para o comportamento rotatório foram induzidos em um grau muito alto por agonistas dopaminérgicos (Lundblad *et al.*, 2002; Ravenscroft *et al.*, 2004) e não foram afetados por compostos que reduzem os escores para os movimentos involuntários anormais axiais, do membro anterior e orofaciais (Lundblad *et al.*, 2002; Dekundy *et al.*, 2007; Dupre *et al.*, 2008). Concluiu-se que os escores para o comportamento rotatório contralateral não fornecem, portanto, uma medida específica das complicações motoras induzidas pela L-DOPA. As rotações podem, no entanto, fornecer índices farmacodinâmicos precisos (Jenner, 2003; Rylander *et al.*, 2010; Lindgren *et al.*, 2007) e também podem ser usadas para monitorar fenômenos semelhantes a um dos efeitos colaterais induzidos pela L-DOPA, chamado *wearing off* (deterioração de fim de dose), caracterizado pela redução da duração do efeito motor da L-DOPA (Papa *et al.*, 1994).

Os movimentos involuntários anormais induzidos em modelos animais exibem o mesmo perfil da discinesia de pico de dose (o padrão de discinesia mais observado clinicamente), aumento da severidade ao longo dos 14 dias do tratamento com L-DOPA e respondem clinicamente a tratamentos antidiscinéticos tais como amantadina e clozapina (Lundblad *et al.*, 2002; Dekundy *et al.*, 2007; Lindgren *et al.*, 2007). Aqui, demonstramos inicialmente que o tratamento crônico (14 dias) com L-DOPA via oral em ratos hemiparkinsonianos com denervação completa de fibras dopaminérgicas no estriado leva à manifestação de movimentos involuntários anormais de forma estável e constante ao longo do período analisado.

Neste estudo, nós também demonstramos que a aplicação aguda de NPS na dose de 2 mg/kg reduziu a discinesia já estabelecida e o tratamento crônico atenuou o desenvolvimento e expressão da discinesia induzida por L-DOPA; este efeito é reproduzido na dose de 4 mg/kg, com uma eficácia ainda maior. O efeito do tratamento crônico com NPS 4 mg/kg sobre a expressão dos marcadores moleculares da discinesia Δ FOS-B, e sobre os inflamatórios COX-2, astrócitos e micróglia também foram

avaliados. O tratamento crônico com NPS4 mg/kg modulou apenas o número de células COX-2 e a expressão dos astrócitos no estriado lesionado quando comparado ao estriado lesionado de animais VEI/L-DOPA.

Verificamos também as concentrações de nitrito tecidual e os níveis dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc no estriado dorsolateral lesionado de ratos tratados cronicamente com L-DOPA, tratados previamente com NPS4 mg/kg ou 7-NI30 mg/kg durante o desenvolvimento da discinesia. O tratamento crônico com L-DOPA aumentou os níveis de nitrito no estriado dorsolateral lesionado; o tratamento crônico com NPS4 mg/kg aumentou ainda mais estes níveis, enquanto que o tratamento com 7-NI30 mg/kg impediu esse aumento no estriado dorsolateral lesionado. O tratamento crônico com L-DOPA também elevou os níveis de AMPc e GMPc na porção dorsolateral do estriado lesionado de ratos discinéticos quando comparado ao estriado dorsolateral lesionado de animais lesionados com a 6-OHDA, sem tratamento com L-DOPA. O tratamento crônico com NPS4 mg/kg e com 7-NI30 mg/kg apresentaram em comum a redução dos níveis de AMPc e da proteína CREB fosforilada no estriado dorsolateral lesionado quando comparado ao grupo tratado com Vei/L-DOPA. Conforme o esperado, houve modulação distinta sobre os níveis de GMPc: o tratamento crônico com NPS4 mg/kg elevou enquanto que o tratamento crônico com 7-NI30 mg/kg reduziu os níveis desse nucleotídeo cíclico no estriado dorsolateral lesionado quando comparado ao estriado lesionado do grupo tratado com Vei/L-DOPA.

O desenvolvimento e expressão da discinesia induzida por L-DOPA é dependente, ao menos em parte, da extensão da lesão produzida pela 6-OHDA.

Neste estudo, utilizamos o modelo experimental da doença de Parkinson induzido em ratos por meio da microinjeção unilateral de 6-OHDA no FPM. Inicialmente, mostramos que os animais com lesão da via nigroestriatal desenvolveram discinesia em resposta à administração de diferentes doses de L-DOPA. A análise imunohistoquímica das fibras TH positivas no estriado relevou que os animais apresentaram diferentes graus de lesão, justificando, pelo menos parcialmente, as diferenças na manifestação da discinesia induzida por L-DOPA nestes animais. Animais que responderam somente ao tratamento com a dose mais alta de L-DOPA (50 mg/kg,

gavagem) apresentaram o que foi considerada uma lesão parcial, isto é, preservação de fibras dopaminérgicas ao longo das estruturas rostro-caudais do estriado. Com base neste estudo determinamos a dose para tratar os animais lesionados com a 6-OHDA.

Aqui, mostramos que uma porcentagem de animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA desenvolveu discinesia em resposta ao tratamento crônico inicial com baixas doses de L-DOPA (iniciado na dose de 10 mg/kg). O restante dos animais respondeu ao tratamento subcrônico (após terem sido expostos cronicamente à L-DOPA, foram tratados oralmente por mais 5 dias) com doses crescentes de L-DOPA. A análise de secções rostrais, mediais e caudais do estriado revelou que animais que desenvolveram discinesia em resposta ao tratamento com doses menores de L-DOPA apresentaram lesão robusta das fibras dopaminérgicas no estriado e animais que não responderam ao tratamento com as doses de 20 e 30 mg/kg de L-DOPA apresentaram fibras remanescentes. É importante ressaltar a importância do estriado dorsal na integração da informação sobre os estados sensoriais e motores transmitidos pelos neurônios corticais e talâmicos, facilitando a seleção de movimentos desejáveis e inibindo movimentos indesejáveis (Gerfen e Bolam, 2017).

Nossos resultados concordam com os dados encontrados por Darmopil *et al.*, (2009), que mostraram que a severidade da discinesia induzida por L-DOPA é proporcional à extensão da lesão dopaminérgica no estriado. No entanto, outros autores mostraram que ratos com altos níveis de lesão dopaminérgica podem apresentar baixos escores de discinesia em resposta ao tratamento crônico com L-DOPA, indicando que a depleção dopaminérgica é necessária, mas não é o único fator necessário para a manifestação da discinesia induzida por L-DOPA (Putteman *et al.*, 2007). De fato, tanto em modelos animais da doença de Parkinson quanto em pacientes parkinsonianos, o tratamento com L-DOPA produz discinesia em intensidades diferentes. Alguns desenvolvem clara e severa discinesia, enquanto outros desenvolvem baixa discinesia ou não desenvolvem (Cenci *et al.*, 1998; Hagell e Widner, 1999; Fiorentini *et al.*, 2006; Rao *et al.*, 2008). Os pacientes com doença de Parkinson apresentam um padrão bilateral desigual de denervação dopaminérgica estriatal, com perda robusta de dopamina no putamen ou estriado dorsal (a parte motora do estriado em humanos e em roedores) em comparação com o núcleo caudado ou estriado ventral (isto é, a parte límbica; Kish *et al.*, 1988)

Outros fatores celulares/moleculares também estão envolvidos na diferença de intensidade de discinesia. De acordo com Soghomonian (2006), a magnitude da

depleção dopaminérgica em outras estruturas dos núcleos da base além do estriado, como núcleo subtalâmico, pode ser uma variável importante na suscetibilidade da discinesia induzida por L-DOPA.

O estudo de Rangel-Barajas *et al.*, (2011), que também investigou as distinções moleculares na discinesia, foi conduzido em duas populações de animais tratados com L-DOPA: animais que desenvolveram severa discinesia e animais que desenvolveram discinesia moderada. A conclusão que os autores tiveram foi baseada na observação que a AC5/6 é supra regulada após a lesão dopaminérgica, e o tratamento crônico com L-DOPA modula a AC e a liberação de [3H]-GABA de uma maneira correlacionada ao efeito comportamental produzido pela L-DOPA. Em ratos com discinesia moderada, o aumento da liberação de [3H]-GABA e produção de AMPc causada pela lesão dopaminérgica é ausente, enquanto que em animais com discinesia severa eles são preservados, sugerindo que as diferenças entre os dois grupos são associadas com diferentes respostas à via de sinalização do AMPc.

Embora nossos resultados mostrem que é necessária uma lesão robusta das fibras dopaminérgicas no estriado para o desenvolvimento da discinesia, a denervação sozinha não é suficiente para seu desenvolvimento (Cenci, 2017). Outros fatores importantes para a indução da discinesia não foram analisados neste estudo. Por exemplo, a LID correlaciona fortemente com marcadores da atividade nigroestriatal dopaminérgica, particularmente com níveis estriatais de preproencefalina (PPE) e prodinorfina (PDyn) (Cenci *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2000), assim como para o gene de expressão imediata Δ FOS-B (Andersson *et al.*, 1999). Resultados de Winkler *et al.*, (2002) mostraram que a injeção intraestriatal de 6-OHDA não aumentou a expressão de PPE, PDyn ou Δ FOS-B na porção medial do estriado e o grau de expressão destes marcadores no estriado dorsolateral correlacionou linearmente com a severidade da discinesia induzida por L-DOPA. Ainda, os autores mostraram que 5% a 6% de fibras dopaminérgicas poupadas na porção medial do estriado são suficientes para prevenir mudanças na expressão de PPE, PDyn, ou Δ FOS-B nesta região.

Com exceção do primeiro experimento onde os grupos apresentaram diferentes níveis de lesão, nos demais experimentos foram selecionados e mantidos nos grupos experimentais apenas animais que apresentaram lesão total da via nigroestriatal, evidenciada pelo teste de caminhada, comprovada através da imunohistoquímica para TH e pelos escores atribuídos para os movimentos involuntários anormais. Animais que apresentaram lesão parcial foram excluídos do estudo.

Dessa forma, a concentração de 6-OHDA utilizada no estudo produziu lesão robusta da via nigroestriatal e preservação das células da área tegmental ventral. A dose de 20 mg/kg de L-DOPA selecionada com base no primeiro experimento foi essencial para a indução dos movimentos involuntários anormais através do tratamento crônico com L-DOPA e excluiu possíveis flutuações na discinesia que ocorrem com baixas doses de L-DOPA.

A aplicação aguda ou crônica de NPS2 e 4 mg/kg reduziu a discinesia já estabelecida ou atenuou o surgimento da discinesia induzida pela L-DOPA.

O efeito antidiscinético do NPS em ratos hemiparkinsonianos - sistema nitrgico:

Nos experimentos cujo objetivo foi verificar o efeito da aplicação de NPS2 mg/kg ou 4 mg/kg sobre o desenvolvimento da discinesia, os animais foram selecionados através do teste de caminhada e foram igualmente distribuídos em grupos experimentais de acordo com a porcentagem de uso do membro anterior contralateral à lesão em relação ao total de passadas.

Em animais já discinéticos, a aplicação aguda de NPS nas doses de 2 e 4 mg/kg reduziu aproximadamente 60% e 90%, respectivamente, dos escores aplicados para os movimentos involuntários anormais. A aplicação aguda de NPS 2 ou 4 mg/kg não interferiu com o efeito benéfico da L-DOPA no teste de caminhada ou com a locomoção no teste de campo aberto. Os resultados obtidos com o NPS neste trabalho corroboram os resultados encontrados por Bortolanza *et al.*, (2016).

O tratamento crônico com NPS 2 e 4 mg/kg atenuou, respectivamente, aproximadamente 60% e 80% do surgimento e expressão dos movimentos involuntários anormais. O tratamento crônico com NPS 4 mg/kg não prejudicou a atividade locomotora, porém, prejudicou o efeito benéfico da L-DOPA observado no teste de caminhada. A dose de 2 mg/kg, por outro lado, não prejudicou a atividade locomotora dos animais e também não interferiu com o efeito benéfico da L-DOPA no teste de caminhada.

A fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA é complexa. Estudos sugerem o envolvimento de vários sistemas neurotransmissores e não somente o dopaminérgico, dentre eles o glutamato, serotonina, noradrenalina e o receptor

canabinóide (González-Aparicio e Moratalla, 2014; Huot *et al.*, 2013; Iravani e Jenner, 2011). No entanto, a exata contribuição de cada sistema neurotransmissor no mecanismo molecular da discinesia ainda não está completamente elucidada.

O neurotransmissor gasoso NO emerge como candidato e seu envolvimento na discinesia induzida por L-DOPA foi demonstrado em trabalhos do grupo e corroborado por outros grupos de pesquisa. Estudos indicam que a via de sinalização do NO pode estar prejudicada em cérebros pós-morte de pacientes com doença de Parkinson (Bockelmann *et al.*, 1994; Eve *et al.*, 1998) e em modelos animais da doença (De Vente *et al.*, 2000; Sahach *et al.*, 2000; Barthwal *et al.*, 2001; Sancesario *et al.*, 2004). Estudos mostraram que o RNA mensageiro e a proteína da enzima GCs estão aumentados no estriado denervado de camundongos (Chalimoniuk *et al.*, 2004; Chalimoniuk e Langfort, 2007). Tseng *et al.*, (2011) mostraram que os níveis teciduais de GMPc no estriado de ratos exibindo acima de 90% de lesão dopaminérgica estão elevados. Adicionalmente, foi demonstrado que os níveis de GMPc estão aumentados no soro (Chalimoniuk e Stepien, 2004) e no cerebelo (Gumulka *et al.*, 1976) de pacientes parkinsonianos sob terapia com L-DOPA. Os níveis extracelulares de GMPc estão elevados no globo pálido interno durante a estimulação cerebral clinicamente efetiva em pacientes (Stefani *et al.*, 2005).

Estes resultados sugerem que a via de sinalização NO/GCs/GMPc pode estar alterada na doença de Parkinson e pode refletir distúrbios funcionais entre os neurotransmissores dopamina e glutamato no estriado denervado, causados pelo uso crônico de L-DOPA (West, 2017).

O NO participa da regulação de vários processos fisiológicos e patológicos envolvidos na periferia e no sistema nervoso central (Boehning e Snyder, 2003; Bredt, 2003; Garthwaite, 2008). Evidências apontam uma provável interação entre o NO e a transmissão dopaminérgica em regiões do circuito nigroestriatal (Del Bel *et al.*, 2005; 2011). Sabe-se que o NO desempenha papel importante no comportamento motor, podendo modular a neurotransmissão e integrar a informação processada pelos núcleos da base (Centonze *et al.*, 2003; Del Bel *et al.*, 2005; West e Grace, 2004). Nosso grupo (Padovan-Neto *et al.* 2009; 2015; Bortolanza *et al.*, 2016) e outros grupos de pesquisa (Takuma *et al.*, 2012; Yuste *et al.*, 2012; Solís *et al.*, 2015), mostraram que o 7-NI, inibidor preferencial da isoforma neuronal da enzima NOS bloqueia a discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA em roedores, sugerindo que a inibição desta cascata de sinalização pode ser um mecanismo terapêutico para a discinesia

induzida por L-DOPA. Na discinesia induzida por L-DOPA, a aplicação intracerebroventricular de azul de metileno, inibidor não seletivo da GCs, ou do inibidor seletivo da GCs ODQ reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos, sugerindo também uma disfunção nitrérgica em modelos animais da discinesia (Bariotto-dos-Santos, Padovan-Neto *et al.*, 2018). Com base nesse conjunto de resultados, é possível sugerir que a via de sinalização do NO (NO/GCs/GMPc) está aumentada na discinesia, uma vez que inibidores dessa via de sinalização apresentam efeito antidiscinético.

De forma controversa, a aplicação de molsidomine, outro doador de NO, reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em camundongos deficientes para o fator de transcrição Pitx3 (Solís *et al.*, 2015). Neste mesmo estudo, os autores também avaliaram o efeito do aumento de GMPc através da aplicação via subcutânea de zaprinaste, droga que inibe as fosfodiesterases 5, 6 e 9. O aumento dos níveis intracelulares de GMPc reduziu a discinesia induzida por L-DOPA, porém, também prejudicou a performance motora dos animais no rotarod quando comparado ao grupo controle (Vei/L-DOPA).

A via de sinalização NO/GCs/GMPc facilita a transmissão corticoestriatal e mudanças na eficácia sináptica (Ondracek *et al.*, 2008; Padovan-Neto *et al.*, 2015; Sammut *et al.*, 2010; West e Grace, 2004) sugerindo que o aumento da responsividade sináptica ao NO e a produção de GMPc exacerba a hiperatividade observada na via indireta no estriado denervado (West, 2017). A plasticidade sináptica diz respeito a uma ampla variedade de mudanças sinápticas que ocorrem em neurônios em resposta a eventos fisiológicos específicos, com o objetivo final de adaptação à nova informação. As duas principais formas de plasticidade sináptica expressas no cérebro são a LTP e LTD (Malenka e Bear 2004; Calabresi *et al.*, 1992a, b; Lovinger *et al.*, 1993). O tratamento inicial com L-DOPA leva a restauração da plasticidade sináptica; no entanto, o uso prolongado leva ao desenvolvimento de movimentos involuntários anormais e tem sido associado ao prejuízo desta plasticidade em sinapses corticoestriatais em roedores lesionados pela 6-OHDA (Picconi *et al.* 2003; 2008; Cerovic *et al.* 2015; Belujon *et al.* 2010).

A LTD induzida pela estimulação de alta frequência pode ser mimetizada por doadores de NO, tais como o SNAP (N-Acetyl-3-(nitrosothio)-DL-valine, S-Nitroso-N-acetylpenicillamine) e hidroxilamina, e pelo zaprinaste, inibidor das fosfodiesterases 5, 6 e 9, específicas para o GMPc e pode ser bloqueada pelos inibidores da enzima NOS, L-NAME (NG-nitro-L-arginine methyl estere), 7-NINA (7-Nitroindazole monosodium

salt) e pela aplicação intracelular de ODQ, inibidor seletivo da GCs (Calabresi *et al.*, 1999b).

Uma vez que a aplicação de doadores de NO mimetizam a plasticidade sináptica (Calabresi *et al.*, 1999b), pode ser que o NPS também reproduza estes efeitos sobre a plasticidade sináptica estriatal.

É importante ressaltar que a habilidade de ambos, doador e inibidor em promover efeitos semelhantes foi descrita em outros estudos, como por exemplo, na prevenção do prejuízo induzido pela anfetamina ou seu análogo metilfenidato no teste de inibição pré pulso (Issy *et al.*, 2009; 2014a; 2014b; Salum *et al.*, 2006; 2011). Os doadores de NO pertencem a diferentes classes químicas, com diferentes perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos e os seus efeitos não estão completamente elucidados (Miller e Megson, 2007). Além de ser utilizado em hospitais em crises hipertensivas, estudos clínicos têm mostrado benefícios do NPS sobre os déficits cognitivos de pacientes com esquizofrenia (Maia-de-Oliveira *et al.*, 2015). No entanto, estes resultados são questionados e pesquisas sugerem que as ações benéficas no NPS podem depender de fatores como o histórico da esquizofrenia (Stone *et al.*, 2016).

A síntese de NO pela enzima NOS é regulada por uma alça de *feedback* negativo (Kopincová *et al.*, 2011; Griscavage *et al.*, 1994). O NO em altas concentrações, liberado por doadores exógenos, poderia inibir a atividade da NOS, modulando seu próprio efeito. Uma vez que a estimulação dos receptores de glutamato do tipo NMDA induz fisiologicamente a síntese de NO, a alça de *feedback* negativo do NO também impediria a estimulação desse receptor (Kopincová *et al.*, 2011; Griscavage *et al.*, 1994). O aumento da neurotransmissão glutamatérgica está associado à discinesia induzida por L-DOPA (Morin e Di Paolo 2014; Huot *et al.*, 2013; Ahmed *et al.*, 2011; Rylander *et al.*, 2009). Esse resultado é suportado pelo efeito antidiscinético da amantadina, antagonista não competitivo do receptor de glutamato do tipo NMDA em pacientes parkinsonianos (Blanpied *et al.*, 2005; Luginer *et al.*, 2000; Metman *et al.*, 1999). O NO pode inibir o receptor NMDA por nitrosilação de proteínas e desestabilização de proteínas sinápticas (Kopincová *et al.*, 2011). Durante a nitrosilação, o NO pode regular simultaneamente as proteínas sinápticas e as interações entre elas para controlar com precisão a transmissão sináptica do receptor NMDA. Consequentemente, altas concentrações de NO podem gerar uma força motriz inibidora na atividade da enzima NOS e nos receptores NMDA, semelhantes ao inibidor da

isoforma neuronal da enzima NOS (Wang *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2011; Mustafa *et al.*, 2007).

Mecanismo de ação do doador de NO sobre a discinesia induzida por L-DOPA: análises moleculares.

Avaliamos o efeito do NPS sobre a expressão de marcadores moleculares classicamente envolvidos na discinesia induzida por L-DOPA, como o gene de expressão imediata Δ FOS-B, e marcadores neuroinflamatórios, como as células COX-2 positivas, micróglia marcada com OX-42 e astrócitos marcados com GFAP no estriado lesionado. Além disso, medimos os níveis estriatais do metabólito de NO, nitrito, e analisamos os níveis de GMPc e AMPc após o tratamento crônico com L-DOPA e com as drogas que promovem efeito anti-discinético, NPS e 7-NI.

Núcleos Δ FOS-B-positivos: Genes de expressão imediata são expressos no cérebro em resposta a drogas, estresse e eventos crônicos (Hyman e Nestler, 1996). Essas moléculas participam da regulação da transcrição que pode levar a persistentes mudanças na plasticidade de neurônios estriatais (Kelleher *et al.*, 2004; Santini *et al.*, 2009). De particular interesse são as modificações pós-tradução de H3 e H4 (Ser10-histona H3) e aumento de Δ FosB, que significativamente impacta a expressão de vários genes (Nicholas, 2008; Nestler *et al.*, 2001; Nestler, 2015). O Δ FOS-B é expresso em neurônios de projeção espinhosos da via direta (Andersson *et al.*, 1999; Kelz *et al.*, 1999). Dessa forma, a expressão de Δ FOS-B está relacionada a receptores dopaminérgicos do tipo D1 (Darmopil *et al.*, 2009; Doucet *et al.*, 1996; Westin *et al.*, 2007). O grande e constante acúmulo de Δ FosB em neurônios de projeção espinhosos pode, portanto, ser um fator primário na cascata molecular da discinesia induzida por L-DOPA (Beck *et al.*, 2019). O aumento de Δ FOS-B induzido pelo tratamento com L-DOPA (Andersson *et al.*, 2001; Cenci *et al.*, 2009; Pavon *et al.*, 2006) é proposto como o principal marcador pós-sináptico estriatal da discinesia induzida por L-DOPA em roedores e primatas e correlaciona com a severidade da discinesia (Andersson *et al.*, 1999; Valastro *et al.*, 2007). A importância do aumento de Δ FOS-B na discinesia induzida por L-DOPA é suportada pelo efeito antidiscinético obtido após o silenciamento do gene Δ FosB em neurônios de projeção espinhosos (Engeln *et al.*, 2016). Esses dados são corroborados por análises eletrofisiológicas e comportamentais

que mostraram que o aumento da expressão de Δ FosB no estriado de primatas parkinsonianos com robusta depleção de dopamina, porém sem tratamento com L-DOPA, levou a uma resposta anormal dos neurônios de projeção espinhosos frente à estimulação dopaminérgica e expressão da discinesia induzida por L-DOPA (Beck *et al.*, 2019).

Nossos dados mostraram que o tratamento com L-DOPA aumentou significativamente a expressão de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado dorsal de ratos discinéticos. A aplicação aguda de NPS 4 mg/kg diminuiu apenas de forma marginal o número de núcleos marcados positivamente para Δ FOS-B no estriado dorsal. Por outro lado, o tratamento crônico com NPS4 durante o desenvolvimento da discinesia não atenuou a expressão de Δ FOS-B no estriado dorsal ipsilateral à lesão quando comparado ao grupo Vei/L-DOPA.

Resultados do grupo e da literatura demonstraram redução de Δ FOS-B no estriado dorsal ipsilateral à lesão em ratos (Padovan-Neto *et al.*, 2015) e no modelo genético de camundongos *Pitx3*^(-/-) (Solís *et al.*, 2015) após tratamento agudo ou crônico com 7-NI. Contudo, também há descrição de resultados distintos. Thiriet *et al.*, (2006) mostraram distinto padrão de modulação de Δ FOS-B no cérebro de ratos após aplicação i.c.v. de NPS. No estriado, uma única aplicação i.c.v. de NPS reduziu a expressão de Δ FOS-B induzida pela aplicação via intraperitoneal de cocaína. No núcleo acumbens, a aplicação i.c.v. de NPS *per se* induziu aumento de Δ FOS-B.

Apesar de todos os dados descrevendo a ação de inibidores da NOS sobre a expressão de genes de resposta imediata, não existem dados na literatura mostrando a modulação da expressão de fatores moleculares associados à discinesia induzida por L-DOPA após tratamento agudo ou crônico com doadores de NO. É importante ressaltar que embora ambas as drogas apresentem efeito antidiscinético, elas possuem ação antagônica sobre o sistema nitrérgico. Isto sugere que o NPS pode estar agindo sobre mecanismos alternativos ao já conhecido mecanismo do 7-NI sobre a expressão de Δ FOS-B.

A regulação da expressão de genes induzida pelo NO é complexa, uma que o NO ativa diversas vias de sinalização para regular a expressão de genes (Hemish *et al.*, 2003). Usando ambos inibidores farmacológicos e abordagem genética para identificar vias de sinalização específicas utilizadas pelo NO para ativar a expressão de genes, Hemish *et al.*, (2003) mostraram que há distintos eventos de indução gênica iniciados pelo NO. O primeiro evento ativa genes de expressão imediata tais como *c-FOS*. A

segunda etapa da ativação pode incluir alvos diretos dos fatores de transcrição ativados no primeiro evento. Finalmente, a terceira etapa de ativação inicia aproximadamente 12 horas após a adição de doadores de NO, SNAP e L-NAME. Esses genes ativados na terceira etapa podem representar alvos dos genes ativados na segunda etapa. Os genes ativados inicialmente, tais como c-FOS são de particular interesse porque sua ativação pode refletir mudanças na maquinaria de transcrição, como, por exemplo, S-nitrosilação de alguns fatores de transcrição (Demple, 2002; Kim *et al.*, 2002). Muitos dos genes estudados por Hemish *et al.*, (2003) foram ativados dentro de 30 min após a adição do doador de NO, SNAP, alguns foram ativados mais cedo, entre 10-15 min após a adição do doador. A ativação de alguns genes pelo NO não foi afetada por nenhum dos inibidores testados, sugerindo que eles são induzidos por outras vias ainda não identificadas. Ao mesmo tempo, a ativação de alguns genes foi sensível a mais de um inibidor, sugerindo que o NO pode introduzir profundas mudanças na fisiologia da célula produzindo uma resposta transcricional e alterando o perfil do RNAm da célula (Hemish *et al.*, 2003).

Mecanismos inflamatórios envolvidos na discinesia induzida por L-DOPA:

A inflamação crônica está presente no cérebro de pacientes com doença de Parkinson e foi primeiramente demonstrada por McGeer *et al.*, (1988) em estudos pós-morte. Desde então, diversos outros trabalhos vêm apontando a participação de um processo inflamatório na doença de Parkinson (Banati *et al.*, 1998; Hunot *et al.*, 1997; Knott *et al.*, 2000; Mogi *et al.*, 1994; 1995; 2007; Tansey e Goldberg, 2010). A discinesia induzida por L-DOPA também está relacionada com um ambiente pró-inflamatório no estriado e que esse ambiente pode ser induzido por níveis aumentados de glutamato (Buck e Ferger, 2008; Picconi *et al.*, 2002; Robelet *et al.*, 2004) e dopamina (Meissner *et al.*, 2006) liberados após a administração de L-DOPA.

O papel neuroinflamatório na discinesia induzida por L-DOPA é suportada pelo efeito antidiscinético do tratamento com a corticosterona, um hormônio com ação anti-inflamatória no modelo animal de discinesia induzida por L-DOPA em roedores (Barnum *et al.*, 2008), entre outros trabalhos. Tem sido proposto um papel para o NO na inflamação (Coleman, 2001; Guzik *et al.*, 2003; Tripathi *et al.*, 2007) e nos processos inflamatórios na doença de Parkinson (Hunot *et al.*, 1996; L'Episcopo *et al.*, 2010). Foram encontrados altos níveis da isoforma neuronal (Eve *et al.*, 1998) e induzida

(Hunot *et al.*, 1996; Knott *et al.*, 2000) da enzima NOS na SN e no estriado pós-morte de pacientes parkinsonianos.

Células COX-2-positivas: Neste estudo, nós mostramos que a aplicação aguda ou crônica de NPS4, reduziu marginalmente o número de células COX-2 positivas no estriado lesionado quando comparado ao grupo Vei/L-DOPA. Estudos do grupo mostraram que o tratamento crônico com 7-NI durante o desenvolvimento da discinesia diminuiu de forma significativa a expressão de COX-2 no estriado dorsal (Bortolanza *et al.*, 2015). Consistente com os resultados encontrados por Bortolanza *et al.*, (2015), a administração de L-DOPA em animais *per se* não induziu um aumento da expressão de COX-2 no estriado não lesionado, sugerindo que a lesão dopaminérgica é necessária para os mecanismos que levam a expressão de COX-2.

A interação entre o sistema nitrérgico e a expressão de COX-2 já foi previamente descrita. No entanto, a natureza dessa interação pode depender do sistema ou da situação fisiopatológica em estudo. Foi descrito que o NO *per se* pode induzir a expressão de COX-2 e/ou potencializar a expressão desta enzima desencadeada por outros estímulos (revisado em Pérez-Sala e Santiago Lamas, 2001). Em alguns contextos, os efeitos do NO sobre a expressão da COX-2 induzida por vários agentes são inibitórios (revisado em Pérez-Sala e Santiago Lamas, 2001). O mecanismo pelo qual o NO exerce seus efeitos sobre a expressão de COX-2 não são conhecidos, mas podem ser relacionados aos níveis de NO, tipo celular e/ou estado de ativação das células. Os efeitos do NO sobre a indução de atividade da COX-2 podem depender da concentração de NO, sendo estimulatório com baixos níveis e inibitórios com altos níveis de NO (Swierkosz *et al.*, 1994). No contexto da discinesia, o tratamento com NPS e consequente aumento da concentração de NO central podem ser responsáveis diretos pela inibição modesta encontrada sobre os níveis de COX-2 tanto no estriado dorsal quanto no ventral.

É importante considerar, entretanto, que os produtos dessas enzimas podem exercer um *feedback* e uma regulação recíproca de ambas as vias. A interação entre a isoforma induzida da enzima NOS e COX-2 também foi mostrado em um modelo de isquemia cerebral em ratos, onde a isoforma induzida na enzima NOS pode aumentar a atividade da COX-2 (Nogawa *et al.*, 1998), e os produtos da COX-2 podem modular a expressão da isoforma induzida da enzima NOS (revisado em Pérez-Sala e Santiago Lamas, 2001). Em um modelo de inflamação em roedor, inibidores seletivos da COX-2

reduziram a atividade e expressão da isoforma induzida da enzima NOS, enquanto a inibição da enzima exerceu efeito negativo sobre a via da COX (revisado em Pérez-Sala e Santiago Lamas, 2001).

A neuroinflamação não é a única possível razão para o surgimento de fatores classicamente pró-inflamatórios no estriado de animais discinéticos, como a COX-2: esta enzima também pode estar agindo como um gene de resposta imediata. A expressão aumentada da enzima COX-2 no estriado de ratos discinéticos pode ser consequência do aumento da formação de LTP estriatal. Calabresi *et al.* (2000; 2008) através de seus trabalhos sugerem que a ativação cortical repetitiva pode gerar LTD ou LTP em sinapses corticoestriatais dependendo do subtipo de receptor de glutamato ativado durante a fase de indução dessas formas de plasticidade sináptica. A COX-2 é constitutiva em regiões que envolvem formação de LTP, como por exemplo, o giro denteado do hipocampo. Nestas regiões, a COX-2 é capaz de ser produzida em neurônios com aferências glutamatérgicas (Yamagata *et al.*, 1993) envolvidos na formação de LTP (Bliss e Collingridge, 1993). Desta forma, o aumento da expressão de COX-2 em neurônios do estriado lesionado e/ou a redução de COX-2 no estriado de animais discinéticos pelo aumento de NO pode estar relacionada à regulação da plasticidade sináptica estriatal e, indiretamente, à modulação da expressão de COX-2.

Micróglia (analisados por imunohistoquímica para OX-42): O tratamento agudo com L-DOPA elevou a expressão da micróglia marcada com OX-42 no estriado lesionado, corroborando dados previamente publicados (Bortolanza *et al.*, 2015a, Mulas *et al.*, 2016). Os grupos destinados ao tratamento crônico com NPS, entretanto, apresentaram apenas uma tendência a aumentar a expressão de OX-42. Em nenhum dos casos, o NPS foi eficaz em diminuir a expressão de micróglia após o tratamento com L-DOPA. É importante citar que, neste estudo, encontramos expressão basal elevada e difusa da micróglia em todos os grupos analisados (6-OHDA/Vei/SAL; 6-OHDA/Vei/NPS4; 6-OHDA/Vei/L-DOPA; 6-OHDA/NPS4/L-DOPA), tanto no estriado contralateral quanto o ipsilateral à lesão. A micróglia é constitutiva ao longo de todo o encéfalo, o que gera uma alta expressão basal de células e pode prejudicar a análise por densidade ótica.

Após a lesão dopaminérgica ou dano cerebral, a população microglial aumenta dramaticamente e pode representar 12% das células totais do cérebro (Gonzalez-Scarano e Baltuch, 1999). Embora a ativação microglial tenha uma importante função

reparadora, uma vez ativada no ambiente degenerado suas ações vão além, podendo sobrepor seus efeitos benéficos (Roy *et al.*, 2006). Estudos de Roy *et al.*, (2006) realizados em cultura de micróglia mostraram que o NO *per se* é capaz de estimular e aumentar a expressão de CD11b em células microgliais. No mesmo estudo, os autores demonstraram que essa ativação pode aumentar a expressão de CD11b na microglia através da estimulação da via GCs-GMPc-PKG (proteína kinase G) - CREB pelo NO. Desta forma, é possível sugerir que o aumento da sinalização nitrérgica derivada do tratamento com o NPS não seria capaz de prevenir o aumento da ativação microglial induzida pela lesão dopaminérgica e/ou pelo tratamento com L-DOPA.

Em modelos animais da doença de Parkinson, a ativação glial ocorre no sítio de microinjeção da 6-OHDA (Banati *et al.*, 1998) e acompanha a degeneração neuronal (Henry *et al.*, 2009; Maia *et al.*, 2012). Resultados de Bortolanza *et al.*, (2015) mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA eleva a expressão de OX-42 no estriado lesionado, e o tratamento crônico com 7-NI durante o desenvolvimento da discinesia preveniu esse aumento. Mais uma vez, os efeitos antidiscinéticos do doador de NO e do inibidor de NOS se apresentaram divergentes; ou seja, o mecanismo pelo qual o NPS impede a manifestação da discinesia aparentemente não influencia diretamente o estado de ativação microglial. Estudos realizados em modelos animais de doenças neurodegenerativas mostraram que o 7-NI tem propriedades anti-inflamatórias, reduzindo o estresse oxidativo e os níveis de peroxinitrito (Schulz *et al.*, 1997), o que pode justificar esta divergência de resultados.

É importante ressaltar que os efeitos do NO ou doadores de NO dependem do sistema experimental estudado (revisado em Pérez-Sala e Santiago Lamas, 2001). Por exemplo, usando macrófagos RAW 264.7 e cultura primária de células da microglia de rato, foi observado que doadores de NO podem atuar sobre múltiplos níveis para modular a produção de prostanóides e COX-2, exercendo diferentes efeitos nos dois tipos celulares e também no mesmo tipo celular, dependendo do estado de ativação das células (revisado em Pérez-Sala e Santiago Lamas, 2001).

Astrócitos (analisados por imunohistoquímica para GFAP): Sabe-se que os astrócitos influenciam uma variedade de processos nervosos complexos, incluindo sono, aprendizado, memória e respiração (Barres, 2008; Lundgaard *et al.*, 2014). A nível molecular e celular, os astrócitos desempenham um papel crítico na regulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica, respondendo ao estresse oxidativo,

modulando a transmissão sináptica e controlando a sinaptogênese (Wang *et al.*, 2015). Em doenças neurodegenerativas, os astrócitos reagem rapidamente levando a robusta astrogliose (Reier e Houle, 1988; Eng *et al.*, 1992). Embora quando ativados secretem diferentes fatores neurotróficos para sobrevivência neuronal, acredita-se que a ativação rápida e severa inicia uma resposta inflamatória levando a morte neuronal (Tani *et al.*, 1996). A ativação astrogliar após a lesão induzida pela 6-OHDA em ratos foi descrita no córtex (frontal, parietal e piriforme), septo, área tegmental ventral (Gomide *et al.*, 2005) e no núcleo subtalâmico (Henning *et al.*, 2008).

Nosso grupo demonstrou o aumento da expressão de astrócitos no estriado de ratos hemiparkinsonianos apresentando movimentos involuntários anormais após o tratamento crônico com L-DOPA (Bortolanza *et al.*, 2015). Houve um aumento dos corpos celulares dos astrócitos, uma remodelação dos processos e um aumento no número de astrócitos, o que indica gliose reativa. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a inibição crônica da sinalização nitrérgica com 7-NI foi capaz não somente de diminuir a discinesia, mas também reduzir a expressão de astrócitos no estriado lesionado. Aqui, nossos resultados demonstraram que os animais lesionados com a 6-OHDA apresentaram um aumento da expressão de astrócitos no estriado lesionado, e que uma única aplicação de NPS (4 mg/kg) não inibiu o aumento da expressão de astrócitos induzida pela L-DOPA. No entanto, o tratamento crônico com NPS4 mg/kg atenuou a expressão de astrócitos no estriado lesionado quando comparado ao grupo discinético.

A L-DOPA se acumula principalmente nos corpos celulares dos astrócitos, nos prolongamentos astrocitários ao redor dos vasos sanguíneos e nos pericitos (Inyushin *et al.*, 2012). Os astrócitos estriatais atuam como um reservatório de L-DOPA, para que possam absorver ou liberar L-DOPA, dependendo de sua concentração extracelular (Asanuma *et al.*, 2014; Inyushin *et al.*, 2012). Astrócitos em cultura também são capazes de converter LDOPA em dopamina (Juorio *et al.*, 1993; Tsai e Lee, 1996). O efeito terapêutico do L-DOPA ocorre através da descarboxilação e, portanto, sua transformação em dopamina.

A atuação do sistema nitrérgico sobre a expressão de astrócitos ainda está pouco esclarecida. Brown *et al.*, (1995) mostraram que os astrócitos em cultura podem secretar NO em concentrações acima de 1 μ M. Adicionalmente, Brahmachari *et al.*, (2006) mostraram que o NO aumenta a ativação dos astrócitos em cultura e esse aumento ocorre provavelmente através da estimulação da via de sinalização

NO/GCs/GMPc/PKG. Neste trabalho nós demonstramos que o NPS *per se* não aumentou a expressão dos astrócitos no estriado lesionado quando comparado ao não lesionado. Pelo contrário, nós encontramos redução de astrócitos marcados com GFAP no estriado lesionado após tratamento crônico com NPS. O preciso mecanismo de ação do NPS sobre a redução dos marcadores neuroinflamatórios é desconhecido. Dessa forma, mais estudos serão necessários para confirmar os resultados obtidos e investigar o possível mecanismo de ação do NPS sobre os marcadores moleculares clássicos da discinesia.

Mecanismo de ação do doador de NO sobre a discinesia induzida por L-DOPA: análise de segundos mensageiros e metabólitos do NO.

Níveis teciduais de nitrito na discinesia induzida por L-DOPA: Aqui nós demonstramos que a aplicação sistêmica, aguda ou crônica, de NPS reduz significativamente a discinesia induzida por L-DOPA, sugerindo um efeito central. No entanto, em modelos *in vivo*, o NO apresenta uma meia vida curta. Essa habilidade do NO é explorada por facilitar os efeitos locais em resposta a estímulos específicos; o NO rapidamente se dissipa e é oxidado a nitrito e nitrato, sem necessidade de um metabolismo complexo (Miller e Megson, 2007). Uma vez que o NO aplicado periféricamente pode ser rapidamente oxidado, talvez não atingindo estruturas encefálicas, nosso objetivo foi verificar indiretamente as concentrações de NO no estriado dorsolateral de animais tratados cronicamente com o doador e/ou inibidor comparado ao resultado obtido em animais tratados cronicamente com L-DOPA. Devido à dificuldade ao acesso a técnicas que estabeleçam as concentrações específicas de NO tecidual, nós estimamos as concentrações de NO no estriado dorsolateral através do acúmulo de nitrito, principal metabólito do NO.

Nossos resultados corroboram a hipótese de que o aumento de NO pelo NPS é capaz de alcançar o sistema nervoso central e ter sua ação no estriado. Desta forma, sugerimos que a ação antidiscinética do NPS ocorre devido à modulação da disfunção estriatal após o tratamento crônico com L-DOPA. O aumento de nitrito encontrado no estriado dorsal de ratos discinéticos é consistente com os resultados que demonstraram que o tratamento com L-DOPA eleva os níveis de NO e de seu segundo mensageiro GMPc no estriado de pacientes (Chalimoniuk *et al.*, 2004) e no estriado de camundongos apresentando discinesia (Itokawa *et al.*, 2006). O tratamento crônico com

NPS aumentou ainda mais os níveis de nitrito quando comparado ao grupo discinético. Conforme o esperado, o tratamento crônico com 7-NI reduziu significativamente os níveis de nitrito quando comparado ao grupo tratado cronicamente com o doador ou ao grupo tratado com L-DOPA.

Os níveis elevados de nitrito no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão, 60 min após aplicação de NPS, pode ser decorrente de um processo de reciclagem. Hoje, é amplamente aceito que ambos, nitrito e nitrato podem reciclar de volta o NO sob certas condições via uma nova via biológica descrita como via nitrato-nitrito-NO (Lundberg *et al.*, 2008). Há duas maiores fontes de nitrato e nitrito no corpo: a dieta e a via endógena L-arginina-NOS. O NO, gerado pelas enzimas NOS é oxidado no sangue e tecidos para formar nitrato e nitrito (Moncada e Higgs, 1993). Curiosamente, a via clássica de ativação do NO, L-arginina-NOS é dependente de oxigênio, enquanto a via nitrato-nitrito-NO é gradualmente ativada quando os níveis de oxigênio estão baixos (Moncada e Higgs, 1993). Durante muitos anos, o nitrito (NO_3^-) e nitrato (NO_2^-) foram considerados apenas produtos do metabolismo do NO que são excretados pelos rins. No entanto, nas duas últimas décadas, esse conceito mudou. Este processo não requer a atividade da NOS, mas envolve a circulação enterosalivar de nitrato inorgânico. O NPS aplicado periféricamente aumentou significativamente os níveis de nitrito no estriado dorsolateral lesionado quando comparado ao grupo Vei/L-DOPA. É possível hipotetizar que, centralmente, o NO poderia estar sendo reciclado de volta assim como na via periférica nitrato-nitrito-NO.

Envolvimento dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc na discinesia induzida por L-DOPA: Neste estudo, também realizamos medidas dos níveis de AMPc e GMPc no estriado dorsolateral ipsilateral à lesão de ratos discinéticos e de ratos tratados cronicamente com NPS4 mg/kg durante o desenvolvimento da discinesia. Nossos resultados mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA aumenta os níveis de AMPc e GMPc no estriado lesionado de ratos discinéticos quando comparado ao estriado não lesionado. O tratamento crônico tanto com NPS quanto com 7-NI reduziu significativamente os níveis de AMPc. Já para os níveis de GMPc, a modulação pelo NPS e pelo 7-NI foi diferente: conforme o esperado, o tratamento crônico com NPS4 mg/kg aumentou enquanto o tratamento crônico com 7-NI30 mg/kg impediu o aumento dos níveis de GMPc no estriado lesionado.

AMPC e pCREB: Encontramos níveis elevados de ambos, AMPc e GMPc no estriado lesionado de animais tratados cronicamente com L-DOPA. Os nucleotídeos cíclicos são segundos mensageiros envolvidos na modulação da transmissão sináptica, mecanismos homeostáticos e expressão de genes (Greengard, 2001). Os neurônios de projeção espinhosos contêm altos níveis das duas maiores classes de receptores dopaminérgicos. Além disso, os neurônios de projeção espinhosos contêm altos níveis de fosfodiesterases, responsáveis pelo metabolismo de AMPc e GMPc (Menniti *et al.*, 2006).

Os resultados encontrados por nós mostraram que o tratamento crônico com NPS durante o desenvolvimento da discinesia reduz os níveis de AMPc e eleva os níveis intracelulares de GMPc. Podemos sugerir então que um dos mecanismos em comum pelo qual doadores e inibidores da sinalização nitrérgica atuam na modulação da discinesia é através de regulação direta ou indireta dos níveis de AMPc. Entretanto, as concentrações dos nucleotídeos cíclicos mudam rapidamente (dentro de minutos) durante a anoxia produzida pela decapitação, sendo assim difícil obter níveis precisos de suas concentrações em muitas regiões do cérebro (Lust *et al.*, 1973).

O efeito em comum de ambos, NPS e 7-NI, sobre a redução dos níveis intracelulares de AMPc também foi descrito por Issy *et al.*, (2018) no estriado dorsal e córtex em *ex vivo*. Embora não tenham sido realizadas medidas comparando os níveis de ambos os nucleotídeos cíclicos no estriado lesionado ao estriado não lesionado, a L-DOPA aumentou os níveis destes nucleotídeos no estriado lesionado quando comparado a animais lesionados sem tratamento com L-DOPA. Entretanto, resultados divergentes também foram descritos: outros estudos mostraram que os níveis estriatais de AMPc e GMPc estão reduzidos em ratos discinéticos (Giorgi *et al.*, 2008).

Diferentes isoformas da AC podem ser alvos do NO e podem ser alteradas de forma isoforma-específica (Tao *et al.*, 1998). Como dito anteriormente, a AC5 é detectável somente no estriado (Mons e Cooper, 1995). Estudos realizados em membranas estriatais de rato mostraram que um sítio da AC5 é inibido por doadores de NO (Hudson *et al.*, 2001). Tao *et al.*, (1998) sugerem que muito provavelmente o mecanismo pelo qual o NO inibe a AC seja através da S-nitrosilação, uma vez que a forma NO^+ reage com resíduos cisteína em proteínas formando S-nitrosothiols (Stamler, 1994). É importante ressaltar que embora a AC5 seja expressa no estriado, ela pode não ser a única isoforma presente, uma vez que o estriado consiste em vários tipos celulares neuronais e não neuronais (Calabresi *et al.* 2000). A atividade regulada pela $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$,

representando as isoformas 1, 3 e 8 da AC foram descritas em membranas de células estriatais (Ahlijanian e Cooper, 1988). Estudos com hibridização *in situ* também tem sugerido também a presença das isoformas 2, 4 e 7 no estriado (Mons *et al.* 1993).

A redução reversível gradual de dois elétrons do NPS (NO^+ a NO^-) é o provável mecanismo de liberação de NO (Smith e Dasgupta, 2010). A S-Nitrosilação, que aparentemente é o mecanismo pelo qual o NO atenua a atividade da AC (Tao *et al.* 1998; McVey *et al.* 1999), é fortemente favorecido pela forma NO^+ (revisado em Anand e Stamler, 2012). O NO participa da transdução de sinal celular em grande parte através da S-nitrosilação do local ativo ou alostérico do sítio cisteína nas proteínas, formando S-nitroso-proteínas (*SNO-Proteins*). Demonstrou-se que a nitrosilação de proteínas afeta uma ampla gama de parâmetros funcionais incluindo atividade enzimática, localização subcelular, interações entre as proteínas proteína-proteína e estabilidade proteica. O desequilíbrio da S-nitrosilação tem sido associado como causa ou consequência de várias doenças, incluindo asma, fibrose cística e a doença de Parkinson (revisado em Anand e Stamler, 2012).

Neste estudo nós avaliamos a expressão da proteína CREB fosforilada no estriado lesionado de animais tratados cronicamente com NPS4 e/ou 7-NI30 + L-DOPA ou somente com L-DOPA. CREB é amplamente expressa no cérebro e é umas das proteínas mais importantes na plasticidade sináptica (revisado em Benito e Barco, 2010). A ativação de CREB é considerada fundamental na neurogênese embrionária, regulando a sobrevivência celular, proliferação e diferenciação e na neurogênese adulta, onde sua principal função envolve processos relacionados à consolidação e formação de memória e aprendizado (Viola *et al.*, 2000; Mizuno *et al.*, 2002; Benito e Barco, 2010). A ligação de CREB ao elemento de resposta ao AMPc no DNA permite que uma histona acetiltransferase catalise a acetilação da histona, causando um aumento na transcrição de genes de resposta imediata tais como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), c-FOS, entre outros (Kandel, 2012). A via de sinalização NO/GMPc está envolvida na ativação de CREB pela fosforilação via a cascata de sinalização MAPK-ERK (Adams *et al.*, 2000; Ota *et al.*, 2008). Em coordenação com a sinalização AMPc/PKA, a ativação da via NO/cGMP/PKG é um evento crucial que contribui para a plasticidade sináptica, aquisição e consolidação de memória através de alterações mediadas por CREB na expressão gênica (Lu *et al.*, 1999; Bernabeu *et al.*, 1996; Bollen *et al.*, 2014).

Nossos resultados também mostraram que a atenuação do desenvolvimento da discinesia através do tratamento crônico com NPS ou 7-NI foi acompanhada pela redução significativa na expressão da proteína CREB fosforilada no estriado lesionado. Estudos realizados em animais mostraram que a discinesia induzida por L-DOPA e as estereotipias dependentes de dopamina são associadas com uma indução de prodinorfina e genes da família Δ FOS em neurônios de projeção espinhosos da via direta (revisado em Graybiel *et al.*, 2000). Tais eventos são mediados pela fosforilação da proteína CREB através da ativação de receptores de dopamina do subtipo D1 e da PKA (Cole *et al.*, 1994; Simpson e McGinty, 1995; Konradi *et al.*, 1996).

A proteína CREB fosforilada tem sido detectada no estriado lesionado de ratos após tratamento com L-DOPA (Cole *et al.*, 1994). A proteína Kinase 1 ativada por mitógeno e estresse (MSK1) é importante componente da cascata de sinalização da ERK, especificamente localizada no núcleo (Deak *et al.*, 1998). A discinesia induzida por L-DOPA é acompanhada por um aumento na fosforilação de MSK1, que ocorre seletivamente em neurônios da via direta (Santini *et al.*, 2007; 2009). A ativação de MSK1 leva a fosforilação de CREB (Brami-Cherrier *et al.*, 2005), que regula a expressão de genes envolvidos na plasticidade sináptica (Carlezon *et al.*, 2005). O tratamento crônico com L-DOPA aumenta a fosforilação de CREB em neurônios estriatais, um efeito mimetizado por agonista de receptores de dopamina D1 e prevenido pela inibição da PKA (Oh *et al.*, 2003).

Portanto, é provável que o aumento da fosforilação de CREB no estriado lesionado produzido pela administração repetida de L-DOPA seja produzido pela ativação concomitante da via de sinalização AMPc/PKA e ERK/MSK1. No entanto, o papel da proteína CREB fosforilada na discinesia induzida por L-DOPA não está completamente esclarecido devido a observação de que a infusão estriatal de oligonucleotídeo antisense contra CREB exacerbou a discinesia induzida por L-DOPA, em vez de reduzi-la (Andersson *et al.*, 2001). Em adição, a fosfoproteína DARPP-32, regulada pela dopamina e pelo AMPc amplifica as respostas produzidas pela estimulação da PKA através da inibição da PP-1 e pode modular a ativação de CREB através das proteínas kinases (MAPKs), ERK1/2 (Fienberg *et al.*, 1998; Greengard, 2001). Neste estudo, demonstramos que a diminuição da discinesia pelo tratamento crônico com NPS4/L-DOPA foi acompanhada pela redução dos níveis de AMPc e da proteína CREB fosforilada no estriado dorsolateral lesionado, indicando a modulação da cascata de sinalização do AMPc.

GMPC e aplicação central de zaprinaste: Juntamente ao AMPc, também foi detectado os níveis de GMPC no estriado lesionado após tratamento crônico com NPS ou 7-NI juntamente com L-DOPA. Encontramos níveis aumentados pelo NPS e reduzidos pelo 7-NI, em comparação ao grupo controle (Vei/L-DOPA). Além disso, avaliamos o efeito da microinjeção intraestriatal de Zaprinaste (e consequente elevação dos níveis de GMPC) sobre a discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA. O protocolo de microinjeção adotado foi baseado no estudo de Picconi *et al.*, (2011).

Contrariamente ao descrito por nós, Giorgi *et al.*, (2008) encontraram níveis reduzidos de GMPC no estriado de ratos hemiparkinsonianos no pico da discinesia. No nosso trabalho, encontramos níveis aumentados de GMPC após 15 minutos do tratamento com L-DOPA. É importante ressaltar que o metabolismo do GMPC difere entre as regiões do cérebro e depende da expressão da PDE naquela região, o que justifica nosso tempo modificado de sacrifício dos animais e pode explicar a diferença nos dados encontrados.

Apesar de sugerirmos o AMPc como possível mecanismo comum para a ação antidiscinética das drogas nitrérgicas, não podemos desconsiderar a importância do controle de GMPC sobre os neurônios espinhosos de projeção no estriado discinético. No estriado, as PDEs 1B, 2A e 10A com substrato dual são amplamente expressas. As PDEs com substrato específico para AMPc 3A, 3B, 4D, 7B, e 8B também são amplamente expressas no estriado. A PDE9A, específica para GMPC é moderadamente expressa no estriado (Bender e Beavo 2006). Embora a expressão da PDE5 no estriado seja muito baixa, há evidências (Domek-Lopacinska e Strosznajder, 2008; Giorgi *et al.*, 2008; Puerta *et al.*, 2009; Solís *et al.*, 2015) que, *in vivo*, a administração de sildenafil e zaprinaste aumenta os níveis de GMPC e afeta o comportamento motor, sugerindo que este nucleotídeo cíclico pode estar modificado no estriado. O aumento dos níveis de GMPC através da inibição das fosfodiesterases produz ativação da PKG e mimetiza ações do NO que representam um fator importante para a indução de LTD após estimulação de alta frequência (Calabresi *et al.*, 1999). Estes resultados sugerem que os efeitos dos inibidores das PDEs na indução da LTD em animais discinéticos são mediados pelo aumento dos níveis de GMPC (Picconi *et al.*, 2011). O zaprinaste pode atravessar a membrana; sendo assim, é possível que quando aplicado intracelular ou intracerebroventricular este composto pode se difundir e atingir outros sítios de ação (Calabresi *et al.*, 1999).

Entretanto, a alteração nos níveis de GMPc também pode explicar a diminuição de AMPc encontrada no modelo de ratos discinéticos após tratamento com NPS. O aumento dos níveis intracelulares de GMPc pode ser eficientemente hidrolisado pela PDE2, altamente expressa no estriado (Repaske *et al.*, 1993; Van Staveren *et al.*, 2003). A PDE2 hidrolisa ambos os nucleotídeos cíclicos, AMPc e GMPc (Erneux *et al.*, 1981; Martins *et al.*, 1982). Na ausência de GMPc, a atividade da PDE2 é baixa. A ligação de concentrações baixas de GMPc (micromolar) ao domínio regulatório GAF-B do terminal amino da PDE2 resulta em um aumento de 5 vezes na taxa de hidrólise de AMPc (Martins *et al.*, 1982; Martinez *et al.*, 2002). Esta hipótese foi demonstrada em registros realizados em neurônios espinhosos de projeção. Os experimentos de Polito *et al.*, (2013) mostraram que um dos principais efeitos funcionais da produção de GMPc desencadeado pelo NO é a ativação da PDE2, que reduz fortemente a resposta ao AMPc em ambos neurônios espinhosos de projeção da via direta e indireta.

A relação entre os níveis aumentados de GMPc no estriado discinético é suportado pelo efeito antidiscinético do zaprinaste, droga que inibe as PDEs 5, 6 e 9 resultando em aumento dos níveis intracelulares deste nucleotídeo. Nossos resultados corroboram os resultados obtidos por Picconi *et al.*, (2011); mostramos que a aplicação intraestriatal de zaprinaste (300 μ M) durante 5 dias (sendo 1 microinjeção por dia) resultou em diminuição dos escores de discinesia. Esse efeito foi corroborado por outros grupos que mostraram efeito antidiscinético de uma única aplicação sistêmica de Zaprinaste na dose de 30 mg/kg (Solís *et al.*, 2015) no modelo genético de camundongos Pitx3^(-/-), que reduziu a discinesia, mas prejudicou a performance motora dos animais no teste do rotarod. Estes dados sugerem que os inibidores das fosfodiesterases podem ser benéficos em equilibrar a homeostase no estriado prejudicado patologicamente (Kostowski *et al.*, 1976; Siuciak *et al.*, 2006; Giorgi *et al.*, 2008; Picconi *et al.*, 2011).

O RNAm, a proteína e a atividade das PDEs foram encontrados aumentados no estriado lesionado de ratos, indicando metabolismo elevado dessas enzimas responsáveis pela hidrólise dos nucleotídeos cíclicos (Sancesario *et al.*, 2004). Essa elevação do metabolismo das PDEs pode ser um mecanismo compensatório induzido em neurônios de projeção espinhosos como resultado da depleção de dopamina estriatal. Corroborando esses resultados, foi demonstrado hiperresponsividade de uma subpopulação de neurônios de projeção espinhosos (40%) em resposta a doadores de NO (Galati *et al.*, 2008). Dessa forma, o *upregulation* da atividade das PDEs poderia

compensar a responsividade anormal dos neurônios de projeção espinhosos em resposta ao NO. Sendo assim, a *down-regulation* da atividade da isoforma neuronal da enzima NOS e consequente redução de NO pode facilitar a normalização nos níveis dos nucleotídeos cíclicos no estriado de ratos lesionados (De Vente *et al.*, 2000; Sahach *et al.*, 2000; Barthwal *et al.*, 2001; Sancesario *et al.*, 2004).

Deficiências do trabalho aqui apresentado.

Inicialmente, uma das dificuldades do projeto foi a de estabelecer uma dose de L-DOPA que através da aplicação via oral (gavagem), fosse capaz de induzir movimentos involuntários anormais nos nossos animais e que essa discinesia fosse mantida estável durante o período de tratamento e quantificações. É importante ressaltar que doses acima de 30 mg/kg, via oral, são consideradas altas e doses abaixo de 20 mg/kg, como por exemplo, 10 mg/kg, geram oscilações na discinesia e prejudicam as quantificações.

Experimentos realizados durante o doutorado, para nosso conhecimento, nos mostraram que a administração de L-DOPA na dose de 6 mg/kg, via subcutânea, durante cinco dias foi capaz de induzir movimentos involuntários anormais em animais já sensibilizados pelo tratamento crônico com L-DOPA, via oral, e que não haviam desenvolvido discinesia em resposta ao tratamento oral. É importante considerar a distinta absorção das drogas pelas diferentes vias de administração.

A partir das análises realizadas (curva dose-resposta e a posterior análise imunohistoquímica para TH), a dose de 20 mg/kg de L-DOPA foi selecionada e utilizada no estudo pois foi capaz de induzir discinesia nos animais após tratamento crônico oral (gavagem) e não promoveu oscilações.

Tínhamos uma proposta inicial de compreender os mecanismos moleculares envolvidos na manifestação da discinesia induzida por L-DOPA dependentes do sistema nitrérgico e do envolvimento de doadores de NO na redução da discinesia.

Para isso, grupos independentes de animais tiveram uma cânula implantada no estriado dorsal e/ou no ventrículo lateral, ipsilateral à lesão produzida pela 6-hidroxidopamina. Após o período de recuperação da cirurgia para implantação de cânula, os animais foram desafiados com drogas capazes de modular os níveis de GMPc e, indiretamente, AMPc.

Resultados de Piconi *et al.*, (2011) mostraram que 5 dias de aplicação de zaprinaste, droga que inibe as PDEs 5, 6 e 9, resultando em elevação extracelular dos níveis de GMPc foi capaz de reduzir a discinesia já estabelecida pela L-DOPA. Neste estudo, nós corroboramos os resultados obtidos por Piconi *et al.*, (2011). Uma única aplicação de zaprinaste por dia durante 5 dias, reduziu a discinesia induzida por L-DOPA. Com exceção do experimento com o zaprinaste 300 μ M, onde os animais foram desafiados 5 dias, sendo uma microinjeção por dia (experimento 10), nos demais experimentos os animais foram desafiados com uma única aplicação no estriado dorsal e/ou no ventrículo lateral de drogas (ver resultados no material suplementar).

Com exceção do experimento com a microinjeção i.c.v. de NS2028, droga que inibe a enzima GCs, nos demais experimentos com microinjeção (ver material suplementar), não observamos modulação da discinesia com apenas uma única microinjeção das drogas quando aplicadas tanto i.c.v. quanto intraestriatal. Entretanto, no nosso modelo, a aplicação de zaprinaste no primeiro dia também não reduziu a LID, sugerindo que a cronicidade da administração central talvez seja fundamental para a modulação de drogas nitrérgicas sobre a LID. Sendo assim, novos experimentos adotando um protocolo experimental subcrônico, serão necessários para compreendermos os efeitos da modulação dos níveis de AMPc e GMPc no estriado lesionado.

É necessário também considerar que os resultados encontrados neste trabalho vão de encontro aos diversos trabalhos utilizando compostos antidiscinéticos, onde a diminuição da discinesia é acompanhada por uma redução característica de fatores moleculares clássicos (como o Δ FOS-B e a p-histona acetilada) e, mais recentemente, de fatores inflamatórios. A ausência de efeito robusto do NPS sobre a expressão dos marcadores moleculares de discinesia analisados é surpreendente, e se reproduzida, cria uma nova discussão sobre a participação e importância destes fatores no desenvolvimento e manifestação da discinesia. Por isso, torna-se fundamental a realização de novos experimentos, com um controle interno (7NI) que já foi demonstrado reduzir os marcadores moleculares de discinesia para a confirmação dos resultados descritos aqui.

CONCLUSÃO

Embora o NPS e o 7-NI apresentem efeito comum em reduzir a discinesia, diferente do 7-NI, a modulação de fatores moleculares associados com a discinesia não foi observada de forma expressiva com o NPS. O NPS e o 7-NI apresentaram em comum a prevenção do aumento dos níveis de AMPc induzidos pelo tratamento com L-DOPA e o aumento da proteína CREB fosforilada no estriado dorsolateral. Com base nos nossos resultados, é possível sugerir que a redução da discinesia pelo NPS pode ser resultado da redução dos níveis de AMPc e normalização dos níveis intracelulares de GMPc no estriado dorsolateral de ratos lesionados com a 6-OHDA. O aumento dos níveis de GMPc induzido pelo NPS pode ser eficientemente hidrolisado pela fosfodiesterase 2 que por sua vez estaria fortemente reduzindo os níveis de AMPc. No entanto, não podemos excluir a participação de outros sistemas, uma vez que o NO, uma vez sintetizado, apresenta amplo mecanismo de ação. Mais estudos serão necessários para contribuir com o conhecimento sobre o mecanismo de ação dos doadores de NO sobre a discinesia induzida por L-DOPA.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

A importância da sinalização nitrérgica estriatal na manifestação da discinesia induzida por L-DOPA:

Nós mostramos anteriormente que a aplicação intraestriatal de zaprinaste durante 5 dias (sendo 1 aplicação por dia) reduziu significativamente a discinesia estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA, sugerindo o estriado como região fundamental para a ação anti-discinética de compostos nitrérgicos. Nossos resultados corroboram os resultados obtidos por Picconi *et al.*, (2011) e Solís *et al.*, (2015), onde o aumento dos níveis intracelulares de GMPc no estriado através da inibição das fosfodiesterases 5, 6 e 9 pelo zaprinaste resultou em redução dos escores de discinesia.

No estriado, a expressão da fosfodiesterase 9 é elevada e a expressão da fosfodiesterase 5 é bem reduzida (Van Staveren *et al.*, 2003; Domek-Lopacinska e Strosznajder, 2005). No entanto, embora a expressão da fosfodiesterase 5 no estriado seja muito baixa, há evidências (Domek-Lopacinska e Strosznajder, 2008; Giorgi *et al.*, 2008; Puerta *et al.*, 2009; Solís *et al.*, 2015) que em *in vivo*, a administração de sildenafil (inibidor da fosfodiesterase 5) e zaprinaste aumenta os níveis de GMPc e afeta o comportamento motor, sugerindo que este nucleotídeo cíclico pode ser modificado no estriado. Portanto, é possível sugerir o estriado substrato efetivo na diminuição da discinesia induzida por drogas que modulam a sinalização nitrérgica.

Objetivo:

Dessa forma, nosso objetivo nesta parte do trabalho foi o de associar os efeitos antidiscinéticos encontrados sistemicamente com o doador de NO (NPS) ou inibidor da isoforma neuronal da enzima NOS (7-NI) a uma ação central. Mais especificamente, confirmar se a aplicação central de drogas que modulam os níveis de GMPc reproduziriam a diminuição da discinesia encontrada com o NPS.

Para tal, verificamos se o NS2028 (droga que inibe seletivamente a GCs, diminuindo a sinalização nitrérgica) ou o BAY736691 (inibidor da fosfodiesterase 9, aumentando a sinalização nitrérgica), teriam ação similar sobre a LID quando aplicadas centralmente em ratos discinéticos. Além disso, tivemos por objetivo comparar o efeito da aplicação intracerebroventricular à aplicação intraestriatal dessas drogas sobre a manifestação da LID. Adicionalmente, nós verificamos o efeito do aumento direto dos níveis intracelulares de GMPc através da aplicação intraestriatal de 8-bromo-GMP,

análogo do GMPc sobre a LID. Por fim, também testamos o efeito do vardenafil, droga que inibe a fosfodiesterase 5, consequentemente aumentando GMPc, sobre a LID.

Desenho experimental:

Ratos apresentando movimentos involuntários anormais tiveram uma cânula inserida no ventrículo lateral e/ou estriado dorsal ipsilateral à lesão. Após o período de recuperação da cirurgia para implantação de cânula (5-7 dias), o tratamento com L-DOPA foi retomado para restabelecimento dos movimentos involuntários anormais (3 dias). Quando os movimentos involuntários anormais se mostraram estáveis, os animais foram desafiados com uma única aplicação intracerebroventricular ou intraestriatal das drogas. Os escores aplicados para os movimentos involuntários anormais foram comparados aos escores aplicados no dia anterior a microinjeção (pré-microinjeção; Vei/L-DOPA).

Entre uma concentração e outra os animais passaram por um período de *washout* de 3 dias. Durante esse período, as aplicações de L-DOPA foram mantidas. É importante ressaltar que, uma vez estabelecida, a discinesia se manifesta a cada administração de L-DOPA (Ahlskog e Muentner, 2001). Desta forma o modelo utilizado, permite submeter os mesmos animais a diferentes concentrações de drogas após um tempo de *washout* entre uma administração e outra.

Resultados:

A aplicação intraestriatal ou intracerebroventricular de inibidor da fosfodiesterase 9 (BAY736691) não modifica a discinesia induzida por L-DOPA.

A aplicação intracerebroventricular, mas não intraestriatal, de NS2028, inibidor da GCs reduz a discinesia induzida por L-DOPA.

Uma única aplicação intracerebroventricular de BAY736691 300 μ M, droga que aumenta os níveis intracelulares de GMPc, não modificou a discinesia axial, do membro anterior, orofacial ou o comportamento rotatório dos animais ($p > 0,05$; **Figura 42 – A e B**). No entanto, quando aplicamos uma droga que reduz os níveis intracelulares de GMPc (NS 2028 10 mM) observamos redução dos escores aplicados para a discinesia ($*p < 0,05$; **Figura 42 - C e D**). Ao final dos experimentos, as cânulas foram

confirmadas no ventrículo lateral, ipsilateral à lesão, entre -0,24 e -0,96 (Grupo BAY 736691); Entre -0,36 e -0,84 (Grupo NS 2028; Paxinos e Watson, 1997; **Figura 44 - A**).

Outro grupo de animais teve uma cânula inserida no estriado dorsal e foram desafiados com BAY736691 nas concentrações de 100 e/ou 300 μ M. A aplicação intraestriatal de BAY736691 100 e/ou 300 μ M não foi capaz de reduzir a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e locomotora ($p > 0,05$; Figura 42 – E e F). Um outro grupo de animais, desafiado com uma única microinjeção intraestriatal de NS2028 nas concentrações de 10 e 30 mM não apresentaram redução da discinesia axial, do membro anterior, orofacial e do comportamento rotatório ($p > 0,05$; Figura 42 – G e H). As cânulas foram confirmadas no estriado dorsal ipsilateral à lesão entre, 0,20 e -0,26; Paxinos e Watson, 1997; **Figura 44 - B**).

Figura 40: Efeito do aumento e/ou diminuição dos níveis intracelulares de GMPc no ventrículo lateral e/ou estriado dorsal à lesão de animais discinéticos.

(A) A aplicação intracerebroventricular de BAY736691 300 μ M não reduziu os escores aplicados para a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (B) comportamento rotatório ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; $n=6$). (C) A aplicação intracerebroventricular de NS2028 10 mM reduziu significativamente a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (D) o comportamento rotatório ($*p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; $n=6$). (E) A aplicação intraestriatal de BAY736691 100 e 300 μ M não reduziu a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (F) o

comportamento rotatório ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; $n=9$) **(G)** A aplicação intraestriatal de NS2028 10 e 30 mM não reduziu a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e **(H)** o comportamento rotatório ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; $n=6$). A, B, C e D (Teste t pareado), E, F, G e H (Friedman). Valores apresentados em forma de mediana.

O aumento dos níveis intracelulares de GMPc através da aplicação intraestriatal de inibidor da fosfodiesterase 5 (Vardenafil) e/ou através do análogo do GMPc (8-bromo-GMP) não modifica a discinesia induzida por L-DOPA.

O vardenafil é considerado um inibidor seletivo da fosfodiesterase cinco, cuja inibição resulta em aumento dos níveis intracelulares de GMPc. Nossos resultados mostraram que uma única microinjeção de vardenafil 30 μ M no estriado dorsal lesionado não foi capaz de reduzir a discinesia axial, do membro anterior, orofacial ($W = 7,0$, $p > 0,05$; **Figura 43 - A**) e locomotora ($W = -2,0$, $p > 0,05$; **Figura 43 - B**).

Outro grupo de animais foi utilizado para verificar o efeito do aumento dos níveis de GMPc no estriado dorsal ipsilateral à lesão sobre a discinesia já estabelecida pelo tratamento crônico com L-DOPA. Foram testadas três concentrações crescentes de 8-bromo-GMPc: 0,7, 2 e 6 mM. A aplicação de diferentes concentrações de 8-bromo-GMPc não reduziu a discinesia axial, do membro anterior e orofacial ($\chi^2 = 9,37$; $p > 0,05$; **Figura 43 - C**). Da mesma forma, não houve redução da discinesia locomotora ($\chi^2 = 12,68$; $p > 0,05$; **Figura 43 - D**).

Ao final dos experimentos, as cânulas foram confirmadas no estriado dorsal entre $-0,26$ e $-0,30$ anterior ao bregma (Paxinos e Watson, 1997; **Figura 44 - B**).

Figura 41: Efeito do aumento dos níveis intracelulares de GMPc no estriado dorsal ipsilateral à lesão de animais discinéticos.

(A) A aplicação intraestriatal de vardenafil 30 µM não reduziu a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (B) o comportamento rotatório ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; $n=5$). (C) A aplicação intraestriatal de 8-bromo-GMPc nas concentrações de 0,7, 2 e 6 mM não foi capaz de reduzir a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (D) o comportamento rotatório dos animais ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; $n=5$). (E) Os escores aplicados para a discinesia axial, do membro anterior, orofacial e (F) o comportamento rotatório foram significativamente mais baixos no 5º dia de microinjeção de zaprinaste 300 µM ($*p < 0,05$ vs. Pré; $n=5$). A e B (Teste t pareado); C, D, E e F (Friedman). Valores apresentados em forma de mediana.

Conclusão

Nossos resultados sugerem que não somente o estriado, mas também outras estruturas dos núcleos da base apresentam ação importante na modulação da LID. De fato, estes dados já foram discutidos previamente: por exemplo, Bortolanza *et al.*, (2015a) apontam em seu estudo que estruturas como o globo pálido apresentam alterações na expressão de fatores inflamatórios após o tratamento com L-DOPA, e que o tratamento com 7-NI reverte este aumento. Resultados de Bastide *et al.*, 2014

mostraram aumento de genes como Δ FosB, ARC (proteína associada ao citoesqueleto), FRA2 e Zif268 em estruturas do sistema límbico, núcleo pontino e núcleo cuneiforme.

Entretanto, é importante lembrar a discussão citada anteriormente sobre as condições experimentais nas quais estes resultados foram obtidos. Estes dados foram obtidos utilizando uma única aplicação de drogas no ventrículo lateral ou no estriado. O zaprinaste, conforme demonstrado, apresentou efeito antidiscinéticos após tratamento subcrônico, o que sugere a necessidade da cronicidade do tratamento para a ação antidiscinética, pelo menos das drogas aplicadas centralmente. Portanto, consideramos estes resultados inconclusivos. Considera-se um novo desenho experimental que leve em conta o período prolongado de microinjeção das drogas.

Figura 44: Fotomicrografias mostrando a localização de cânula no (A) ventrículo lateral e no (B) estriado dorsal ipsilateral à lesão.

REFERÊNCIAS

- Abercrombie, E. D., Bonatz, A. E., Zigmond, M. J. (1990). Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Brain Res*, 525, 36-44.
- Adams, J. P., Roberson, E. D., English, J. D., Selcher, J. C., Sweatt, J. D. (2000). MAPK regulation of gene expression in the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 60, 377-394.
- Ahlijanian, M. K., and Cooper, D. M. (1988). Distinct interactions between Ca²⁺/calmodulin and neurotransmitter stimulation of adenylate cyclase in striatum and hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, 8, 459-469.
- Ahmed, I., Bose, S. K., Pavese, N., Ramlackhansingh, A., Turkheimer, F., Hotton, G., Hammers, A., Brooks, D. J. (2011). Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. *Brain*, 134, 979-986.
- Albin, R. L., Young, A. B., Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*, 12, 366-375.
- Ahlskog, J. E., and Muentner, M. D. (2001). Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement Disorders*, 16, 448-458.
- Anand, P., and Stamler, J. S. (2012). Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 90, 233-244.
- Andersson, M., Hilbertson, A., Cenci, M. A. (1999). Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in rat model Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 6, 461-474.
- Andersson, M., Konradi, C., Cenci, M. A. (2001). cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. *J Neurosci*, 21, 9930-9943.
- Andersson, M., Westin, J. E., Cenci, M. A. (2003). Time course of striatal DeltaFosB-like immunoreactivity and prodynorphin mRNA levels after discontinuation of chronic dopaminomimetic treatment. *Eur. J. Neurosci*, 17, 661-666.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001). Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J*, 357, 593-615.
- Altar, C. A., Boyar, W. C., Kim, H. S. (1990). Discriminatory roles for D1 and D2 dopamine receptor subtypes in the in vivo control of neostriatal cyclic GMP. *Eur. J. Pharmacol*, 181, 17-21.
- Ariano, M. A. (1983). Distribution of components of the guanosine 3',5'-phosphate system in rat caudate-putamen. *Neuroscience*, 10, 707-723.

Augustin, S. M., Beeler, J. A., McGehee, D. S., Zhuang, X. (2014). Cyclic AMP and afferent activity govern bidirectional synaptic plasticity in striatopallidal neurons. *J Neurosci*, 34, 6692-6699.

Arnelle, D. R., and Stamler, J. S. (1995). NO⁺, NO, and NO⁻ donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. *Arch Biochem Biophys*, 318, 279-285.

Asanuma, M., Miyazaki, I., Murakami, S., Diaz-Corrales, F.J., Ogawa, N. (2014). Striatal astrocytes act as a reservoir for L-DOPA. *PLoS One*, 9, e106362.

Asin, K.E., Bednarz, L., Nikkel, A., Perner, R. (1995). Rotation and striatal c-fos expression after repeated, daily treatment with selective dopamine receptor agonists and levodopa. *J. Pharmacol. Exp. Ther*, 273, 1483-1490.

Banati, R. B., Daniel, S. E., Blunt, S. B. (1998). Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Mov Disord*, 13, 221-227.

Bariotto-Dos-Santos, K., Padovan-Neto, F. E., Bortolanza, M., Dos-Santos-Pereira, M., Raisman-Vozari, R., Tumas, V., Del Bel, E. (2018). Repurposing an established drug: an emerging role for methylene blue in L-DOPA-induced dyskinesia. *Eur J Neurosci*, 49, 869-882.

Blanpied, T. A., Clarke, R. J., Johnson, J. W. (2005). Amantadine inhibits NMDA receptors by accelerating channel closure during channel block. *J Neurosci*, 25, 3312-3322.

Barnum, C.J., Eskow, K.L., Dupre, K., Blandino, P., Jr., Deak, T., Bishop, C. (2008). Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemiparkinsonian rat: role for interleukin-1beta. *Neuroscience*, 156, 30-41.

Barres, B. A. (2008). The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron*, 60, 430-440.

Barthwal, M. K., Srivastava, N., Dikshit, M. (2001). Role of nitric oxide in a progressive neurodegeneration model of Parkinson's disease in the rat. *Redox Rep*, 6, 297-302.

Bastide, M. F., Dovero, S., Charron, G., Porras, G., Gross, C. E., Fernagut, P.O., Bézard, E. (2014). Immediate-early gene expression in structures outside the basal ganglia is associated to l-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of Disease*, 62, 179–192.

Bateup, H. S., Santini, E., Shen, W. (2010). Distinct subclasses of medium spiny neurons differentially regulate striatal motor behaviors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 14845-14850.

Beaulieu, J. M., Espinoza, S., Gainetdinov, R. R. (2015). Dopamine receptors - IUPHAR Review 13. *Br J Pharmacol*, 172, 1-23.

Beck, G., Singha, A., Zhangc, J., Pottsa, L. F., Wooc, J. M., Park, E. S., Mochizukib, H., Mouradian, M. M., Papaa, S. M. (2019). Role of striatal Δ FosB in L-Dopa-induced dyskinesias of parkinsonian nonhuman primates. *PNAS*, 116, 18664–18672.

Belujon, P., Lodge, D. J., Grace, A. A. (2010). Aberrant striatal plasticity is specifically associated with dyskinesia following levodopa treatment. *Mov Disord*, 25, 1568-1576.

Benarroch, E. E. (2011). Nitric oxide: A pleiotropic signal in the nervous system. *Neurology*, 77, 1568-1576.

Bender, A.T., and Beavo, J. A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacol Ver*, 58, 488-520.

Benito, E., and Barco, A. (2010). CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci*, 33, 230-240.

Bernabeu, R., Schmitz, P., Faillace, M. P., Izquierdo, I., Medina, J. H. (1996). Hippocampal cGMP and cAMP are differentially involved in memory processing of inhibitory avoidance learning. *Neuroreport*, 7, 585-588.

Berthet, J., Rall, T. W., Sutherland, E. W. (1957). The relationship of epinephrine and glucagon to liver phosphorylase. IV. Effect of epinephrine and glucagon on the reactivation of phosphorylase in liver homogenates. *J Biol Chem*, 224, 463–475.

Berton, O., Guigoni, C., Li, Q., Bioulac, B .H., Aubert, I., Gross, C. E., Dileone, R. J., Nestler, E. J., Bezard, E. (2009). Striatal overexpression of DeltaJunD resets L-DOPA-induced dyskinesia in a primate model of Parkinson disease. *Biol Psychiatry*, 66, 554-561.

Bishop, G.A., Chang, H.T., Kitai, S.T. (1982). Morphological and physiological properties of neostriatal neurons: an intracellular horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience*, 7, 179-191.

Bjorklund, A., and Lindvall, O. (1984). Dopamine containing systems in the CNS. In: A., Bjorklund and T., Hokfelt, (Eds.), *Handbook of Chemical Neuroanatomy*, (pp. 55-122), London, Elsevier.

Bliss, T. V., and Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.

Böckelmann, R., Wolf, G., Ransmayr, G., Riederer, P. (1994). NADPH-diaphorase/nitric oxide synthase containing neurons in normal and Parkinson's disease putamen. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect*, 7, 115-121.

Boehning, D., and Snyder, S.H. (2003). Novel neural modulators. *Annu Rev Neurosci*, 26, 105-131.

Bolam, J. P., Clarke, D. J., Smith, A. D., Somogyi, P. (1983). A type of aspiny neuron in the rat, neostriatum accumulates [3H]gamma-aminobutyric acid: combination of

Golgi-staining, autoradiography, and electron microscopy. *J Comp Neurol*, 213, 121–134.

Bollen, E., Puzzo, D., Rutten, K., Privitera, L., De Vry, J., Vanmierlo, T., Kenis, G., Palmeri, A., D'Hooge, R., Balschun, D., Steinbusch, H. M., Blokland, A., Prickaerts, J. (2014). Improved long-term memory via enhancing cGMP-PKG signaling requires cAMP-PKA signaling. *Neuropsychopharmacology*, 39, 2497-2505.

Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F. E., da-Silva, C. A., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E. (2015a). Glial activation is associated with l-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 73, 377-387.

Bortolanza, M., Padovan-Neto, F. E., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Dos Santos-Pereira, M., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E. (2015b) Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370.

Bortolanza M, Bariotto-Dos-Santos, K. D., Dos-Santos-Pereira, M., da-Silva, C. A., Del-Bel, E. (2016). Antidyskinetic Effect of 7-Nitroindazole and Sodium Nitroprusside Associated with Amantadine in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurotox Res*, 30, 88-100.

Boka, G., Anglade, P., Wallach, D., Javoy-Agid, F., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett*, 172, 151-154.

Buck, K., and Ferger, B. (2008). Intrastratial inhibition of aromatic amino acid decarboxylase prevents l-DOPA-induced dyskinesia: a bilateral reverse in vivo microdialysis study in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Neurobiol Dis*, 29, 210-220.

Brahmachari, S., Fung, Y. K., Pahan, K. (2006). Induction of glial fibrillary acidic protein expression in astrocytes by nitric oxide. *J Neurosci*, 26, 4930-4939.

Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Hervé, D., Darragh, J., Corvol, J. C., Pages, C., Arthur, S. J., Girault, J. A., Caboche, J. (2005). Parsing molecular and behavioral effects of cocaine in mitogen- and stress-activated protein kinase-1-deficient mice. *J Neurosci*, 25, 11444-11454.

Breder, C.D., Dewitt, D., Kraig, R.P. (1995). Characterization of inducible cyclooxygenase in rat brain. *J Comp Neurol*, 355, 296-315.

Bredt, D. S., Hwang, P. M., Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 347, 768-770.

Bredt, D. S. (2003). Nitric oxide signaling in brain: potentiating the gain with YC-1. *Mol. Pharmacol*, 63, 1206-1208.

- Brooks, D. J., Salmon, E. P., Mathias, C. J., Quinn, N., Leenders, K. L., Bannister, R., et al. (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's disease, studied with PET. *Brain*, 113, 1539–1552.
- Brown, G. C., Bolaños, J. P., Heales, S. J., Clark, J. B. (1995). Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett*, 193, 201-214.
- Brownstein, M.J., Mroz, E.A., Tappaz, M.L., Leeman, S.E. (1977). On the origin of substance P and glutamic acid decarboxylase (GAD) in the substantia nigra. *Brain Res*, 135, 315-323.
- Buck, K., Voehringer, P., Ferger, B. (2010). Site-specific action of L-3,4-dihydroxyphenylalanine in the striatum but not globus pallidus and substantia nigra pars reticulata evokes dyskinetic movements in chronic L-3,4-dihydroxyphenylalanine-treated 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience*, 166, 355-358.
- Burch, D., and Sheerin, F. (2005). Parkinsons disease. *Lancet*, 365, 622-627.
- Calabresi, P., Maj, R., Pisani, A., Mercuri, N. B., Bernardi, G. (1992a). Long-term synaptic depression in the striatum: physiological and pharmacological characterization. *J Neurosci*, 12, 4224–4233.
- Calabresi, P., Pisani, A., Mercuri, N. B., Bernardi, G. (1992b). Long-term Potentiation in the Striatum is Unmasked by Removing the Voltage-dependent Magnesium Block of NMDA Receptor Channels. *Eur J Neurosci*, 4, 929–935.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A., Bernardi, G. (1999a). Glutamate-triggered events inducing corticostriatal longterm depression. *J. Neurosci*, 19, 6102-6110.
- Calabresi, P., Gubellini, P., Centonze, D., Sancesario, G., Morello, M., Giorgi, M., Pisani, A., Bernardi, G. (1999b). A critical role of the nitric oxide/cGMP pathway in corticostriatal long-term depression. *J. Neurosci*, 19, 2489-2499.
- Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Marfia, G. A., Pisani, A., Sancesario, G., Bernardi, G. (2000). Synaptic transmission in the striatum: from plasticity to neurodegeneration. *Prog Neurobiol*, 61, 231-265.
- Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., Picconi, B. (2008). Molecular mechanisms underlying levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord*, 23, 570-579.
- Calabresi, P., Ghiglieri, V., Mazzocchetti, P., Corbelli, I., Picconi, B. (2015). Levodopa-induced plasticity: a double-edged sword in Parkinson's disease? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370, (1672).

- Cali, J. J., Zwaagstra, J. C., Mons, N., Cooper, D. M., Krupinski, J. (1994). Type VIII adenylyl cyclase. A Ca^{2+} /calmodulin-stimulated enzyme expressed in discrete regions of rat brain. *J Biol Chem*, 269, 12190-12195.
- Cao, X., Yasuda, T., Uthayathas, S., Watts, R. L., Mouradian, M. M., Mochizuki, H., Papa, S. M. (2010). Striatal overexpression of DeltaFosB reproduces chronic levodopa-induced involuntary movements. *J Neurosci*, 30, 7335–7343.
- Jaffrey, S. R., Snowman, A. M., Eliasson, M. J., Cohen, N. A., Snyder, S. H. (1998). CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. *Neuron*, 20, 115-124.
- Carlezon, W. A. Jr, Duman, R. S., Nestler, E. J. (2005). The many faces of CREB. *Trends Neurosci*, 28, 436-445.
- Carlsson, A., Lindqvist, M., Magnusson, T., Waldeck, B. (1958). On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science*, 127, 471.
- Carvey, P. M., Punati, A., Newman, M. B. (2006). Progressive dopamine neuron loss in Parkinson's disease: the multiple hit hypothesis. *Cell Transplant*, 15, 239-250.
- Cenci, M. A., Lee, C. S., Bjorklund, A. (1998). L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin and glutamic acid decarboxylase mRNA. *European Journal of Neuroscience*, 10, 2694–2706.
- Cenci, M. A., Tranberg, A., Andersson, M., Hilbertson, A. (1999). Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-DOPA treatment. *Neuroscience*, 94, 515–527.
- Cenci, M. A., and Ohlin, K. E. (2009). Rodent models of treatment-induced motor complications in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 15, 13–17.
- Cenci, M. A. (2014). Presynaptic mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia: the findings, the debate, and the therapeutic implications. *Frontiers in Neurology*, 5.
- Cenci, M.A. (2017). Molecular Mechanisms of L-dopa-induced dyskinesia. In H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (2nd ed., pp. 3-32), London, Elsevier.
- Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G., Calabresi, P. (2003). DA, acetylcholine and NO systems interact to induce corticostriatal synaptic plasticity. *Reviews Neuroscience*, 14, 207-216.
- Cepeda, C., and Levine, M. S. (2012). Dopamine-NMDA receptor interactions: twenty years later. *Dev. Neurosci*, 34, 2-4.
- Cerovic, M., Bagetta, V., Pendolino, V., Ghiglieri, V., Fasano, S., Morella, I., Hardingham, N., Heuer, A., Papale, A., Marchisella, F., Giampà, C., Calabresi, P., Picconi, B., Brambilla, R. (2015). Derangement of Ras-guanine nucleotide-releasing

factor 1 (Ras-GRF1) and extracellular signal-regulated kinase (ERK) dependent striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Biol Psychiatry*, 77, 106 -115.

Chalimoniuk, M., Stepie, A., Strosznajder, J. B. (2004). Pergolidemesylate, a dopaminergic receptor agonist, applied with L-DOPA enhances serum antioxidant enzyme activity in Parkinson disease. *Clin. Neuropharmacol*, 27, 223–229.

Chalimoniuk, M., and Stepien, A. (2004). Influence of the therapy with pergolide mesylate plus L-dopa and with L-dopa alone on serum cGMP level in PD patients. *Polish Journal of Pharmacology*, 56, 647-650.

Chalimoniuk, M., and Langfort, J. (2007). The effect of subchronic, intermittent LDOPA treatment on neuronal nitric oxide synthase and soluble guanylyl cyclase expression and activity in the striatum and midbrain of normal and MPTP treated mice. *Neurochem Int*, 50, 821–833.

Chang, J. W., Wachtel, S. R., Young, D., Kang, U. J. (1999). Biochemical and anatomical characterization of forepaw adjusting steps in rat models of Parkinson's disease lesions. *Neuroscience*, 88, 617-628.

Chesselet, M.F., and Robbins, E. (1989). Characterization of striatal neurons expressing high levels of glutamic acid decarboxylase messenger RNA. *Brain Res*, 492, 237-244.

Cole, D. G., Kobierski, L. A., Konradi, C., Hyman, S. E. (1994). 6-Hydroxydopamine lesions of rat substantia nigra up-regulate dopamine-induced phosphorylation of the cAMP-response element-binding protein in striatal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 9631-9635.

Coleman, J. W. (2001). Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol*, 1, 1397-1406.

Conti, M., and Beavo, J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem*, 76, 481-511.

Contin, M., Riva, R., Martinelli, P., Cortelli, P., Albani, F., Baruzzi, A. (1993). Pharmacodynamic modeling of oral levodopa: clinical application in Parkinson's disease. *Neurology*, 43, 367-371.

Contin, M., and Martinelli, P. (2010). Pharmacokinetics of levodopa. *J Neurol*, 257, 253-261.

Cook, J. A., Wink, D. A., Blount, V., Krishna, M. C., Hanbauer, I. (1996). Role of antioxidants in the nitric oxide-elicited inhibition of dopamine uptake in cultured mesencephalic neurons. Insights into potential mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity. *Neurochemistry International*, 28, 609-617.

Cools, R., Lewis, S.J., Clark, L., Barker, R. A., Robbins, T. W. (2007). L-DOPA disrupts activity in the nucleus accumbens during reversal learning in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology*, 32, 180-189.

- Corvol, J. C., Muriel, M. P., Valjent, E., Féger, J., Hanoun, N., Girault, J.A., Hirsch, E.C., Hervé, D. (2004). Persistent increase in olfactory type G-protein alpha subunit levels may underlie D1 receptor functional hypersensitivity in Parkinson disease. *J Neurosci*, 24, 7007-7014.
- Cooper, D. M., Mons, N., Karpen, J. W. (1995). Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature*, 374, 421-424.
- Cotzias, G. C., Van Woert, M. H., Schiffer, L. M. (1967). Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med*, 276, 374-379.
- Cowan, R. L., Wilson, C. J., Emson, P. C., Heizmann, C. W. (1990). Parvalbumincontaining GABAergic interneurons in the rat neostriatum. *J Comp Neurol*, 302, 197-205.
- Darmopil, S., Martín, A. B., De Diego, I. R., Ares, S., Moratalla, R. (2009). Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biol Psychiatry*, 66, 603-613.
- Dauer, W., and Przedborski, S. (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909.
- Dawson, T.M., Bredt, D.S., Fotuhi, M., Hwang, P.M., Snyder, S.H. (1991). Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 88, 7797-7801.
- Deak, M., Clifton, A. D., Lucocq, L. M., Alessi, D. R. (1998). Mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1) is directly activated by MAPK and SAPK2/p38, and may mediate activation of CREB. *EMBO J*, 17, 4426-4441.
- Defer, N., Marinx, O., Stengel, D., Danisova, A., Iourgenko, V., Matsuoka, I., Caput, D., Hanoune, J. (1994). Molecular cloning of the human type VIII adenylyl cyclase. *FEBS Lett*, 351, 109-113.
- Dekundy, A., Lundblad, M., Danysz, W., Cenci, M. A. (2007). Modulation of L-DOPA-induced abnormal involuntary movements by clinically tested compounds: further validation of the rat dyskinesia model. *Behavioural Brain Research*, 179, 76-89.
- Del Bel, E. A., da Silva, C.A., Guimarães, F. S., Bermúdez-Echeverry, M. (2004). Catalepsy induced by intra-striatal administration of nitric oxide synthase inhibitors in rats. *Eur J Pharmacol*, 485, 175-181.
- Del Bel, E. A., Guimaraes, F. S., Bermudez-Echeverry, M., Gomes, M. Z., Schiaveto-de-Souza, A., Padovan-Neto, F. E., Tumas, V., Barion-Cavalcanti, A.P., Lazzarini, M., Nucci-da-Silva, L. P., de Paula-Souza, D. (2005). Role of nitric oxide on motor behavior. *Cell Mol Neurobiol*, 25, 371-392.
- Del-Bel, E. A., Padovan-Neto, F. E., Raisman- Vozari, R., Lazzarini, M. (2011). Role of nitric oxide in motor control: implications for Parkinson's disease pathophysiology and treatment. *Curr Pharm Des*, 17, 471-488.

DeLong, M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends Neurosci*, 13, 281-285.

DeLong, M. R., and Wichmann, T. (2007). Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol*, 64, 20-24.

Demple, B. (2002). Signal transduction by nitric oxide in cellular stress responses. *Mol. Cell. Biochem*, 234–235.

De Vente, J., Markerink-van Ittersum, M., van Abeelen, J., Emson, P. C., Axer, H., Steinbusch, H. W. (2000). NO-mediated cGMP synthesis in cholinergic neurons in the rat forebrain: effects of lesioning dopaminergic or serotonergic pathways on nNOS and cGMP synthesis. *Eur J Neurosci*, 12, 507-519.

Dexter, D.T., and Jenner, P. (2013). Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radic Biol Med*, 62, 132-144.

Dickson, D. W., Fujishiro, H., Orr, C., DelleDonne, A., Josephs, K. A., Frigerio, R., Burnett, M., Parisi, J. E., Klos, K. J., Ahlskog, J. E. (2009). Neuropathology of non-motor features of Parkinson disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 3, 1-5.

DiFiglia, M., Pasik, P., Pasik, T. (1976). A Golgi study of neuronal types in the neostriatum of monkeys. *Brain Res*, 114, 245-256.

Di Stefano, A., Sozio, P., Cacciatore, I., Cocco, A., Giorgioni, G., Costa, B., Montali, M., Lucacchini, A., Martini, C., Spoto, G., Di Pietrantonio, F., Di Matteo, E., Pinnen, F. (2005). Preparation and pharmacological characterization of trans-2-amino-5(6)-fluoro-6 (5)-hydroxy-1-phenyl-2,3-dihydro-1H-indenes as D2-like dopamine receptor agonists. *J. Med. Chem*, 48, 2646-2654.

Domek-Lopacińska, K., and Strosznajder, J. B. (2005). Cyclic GMP metabolism and its role in brain physiology. *J Physiol Pharmacol*, 56, 15-34.

Domek-Lopacińska K., and Strosznajder, J. B. (2008). The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain Res*. 1216, 68-77.

Doucet, J. P., Nakabeppu, Y., Bedard, P. J., Hope, B. T., Nestler, E. J., Jasmin, B. J., Chen, J. S., Iadarola, M. J., St-Jean, M., Wigle, N., Blanchet, P., Grondin, R., Robertson, G. S. (1996). Chronic alterations in dopaminergic neurotransmission produce a persistent elevation of deltaFosB-like protein(s) in both the rodent and primate striatum. *Eur J Neurosci*, 8, 365–381.

Dupre, K. B., Eskow, K. L., Steiniger, A., et al. (2008). Effects of coincident 5- HT1A receptor stimulation and NMDA receptor antagonism on L-DOPA-induced dyskinesia and rotational behaviors in the hemi-parkinsonian rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 199, 99-108.

- Dragunow, M., Robertson, G. S., Faull, R. L., Robertson, H. A., Jansen, K. (1990). D2 dopamine receptor antagonists induce Fos and related proteins in rat striatal neurons. *Neuroscience*, 37, 287-294.
- Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000). Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European journal of biochemistry*, 267, 4912-4916.
- Echeverry, M. B., Salgado, M. L., Ferreira, F. R., da-Silva, C. A., Del Bel, E. A. (2007). Intracerebroventricular administration of nitric oxide-sensitive guanylylcyclase inhibitors induces catalepsy in mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 194, 271-278.
- Ehringer, H., and Hornykiewicz, O. (1960). Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin) im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen des extrapyramidalen Systems. *Klin Wochenschr*, 38, 1236–1239
- Eng, L. F., Yu, A. C., Lee, Y. L. (1992). Astrocytic response to injury. *Prog Brain Res*, 94, 353-365.
- Engeln, M., Bastide, M. F., Toulmé, E., Dehay, B., Bourdenx, M., Doudnikoff, E., Li, Q., Gross, C. E., Boué-Grabot, E., Pisani, A., Bezard, E., Fernagut, P. O. (2016). Selective Inactivation of Striatal FosB/ Δ FosB-Expressing Neurons Alleviates L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Biol Psychiatry*, 79, 354-361.
- Erneux, C., Couchie, D., Dumont, J. E., Baraniak, J., Stec, W. J., Abbad, E. G., Petridis, G., Jastorff, B. (1981). Specificity of cyclic GMP activation of a multi-substrate cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat liver. *Eur J Biochem*, 115, 503-510.
- Eve, D. J., Nisbet, A. P., Kingsbury, A. E., Hewson, E. L., Daniel, S. E., Lees, A. J., Marsden, C. D., Foster, O. J. (1998). Basal ganglia neuronal nitric oxide synthase mRNA expression in Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 63, 62-71.
- Farber, K., and Kettenmann, H. (2005). Physiology of microglial cells. *Brain research. Brain research reviews*, 48, 133-143.
- Feigin, A., Ghilardi, M. F., Carbon, M., Edwards, C., Fukuda, M., Dhawan, V., Margouleff, C., Ghez, C., Eidelberg, D. (2003). Effects of levodopa on motor sequence learning in Parkinson's disease. *Neurology*, 60, 1744-1749.
- Fernagut, P. O. (2017). Etiology and Progression of Parkinson's disease: Cross-Talk Between Environmental Factors and Genetic Vulnerability. In H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (2nd ed., pp. 3-32), London, Elsevier.
- Fienberg, A. A., Hiroi, N., Mermelstein, P. G., Song, W., Snyder, G. L., Nishi, A., Cheramy, A., O'Callaghan, J. P., Miller, D. B., Cole, D. G., Corbett, R., Haile, C. N., Cooper, D. C., Onn, S. P., Grace, A. A., Ouimet, C. C., White, F. J., Hyman, S. E., Surmeier, D. J., Girault, J., Nestler, E. J., Greengard, P. (1998). DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission. *Science*, 281, 838-842.

- Fienberg, A. A., and Greengard, P. (2000). The DARPP-32 knockout mouse. *Brain Res Brain Res Ver*, 31, 313-319.
- Fino, E., Paille, V., Cui, Y., Morera-Herreras, T., Deniau, J. M., Venance, L. (2010). Distinct coincidence detectors govern the corticostriatal spike timing-dependent plasticity. *J Physiol*, 588, 3045-3062.
- Fiorentini, C., Rizzetti, M. C., Busi, C., Bontempi, S., Collo, G., Spano, P., Missale, C. (2006). Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. *Mol Pharmacol*, 69, 805-812.
- Forno, L. S., DeLanney, L. E., Irwin, I., Di Monte, D., Langston, J. W. (1992). Astrocytes and Parkinson's disease. *Prog Brain Res*, 94, 429-436.
- Fujiyama, F., and Masuko, S. (1996). Association of dopaminergic terminals and neurons releasing nitric oxide in the rat striatum: an electron microscopic study using NADPH-diaphorase histochemistry and tyrosine hydroxylase immunohistochemistry. *Brain Res. Bull*, 40, 121-127.
- French, S. J., Ritson, G. P., Hidaka, S., Totterdell, S. (2005). Nucleus accumbens nitric oxide immunoreactive interneurons receive nitric oxide and ventral subicular afferents in rats. *Neuroscience*, 135, 121-131.
- Galati, S., D'Angelo, V., Scarnati, E., Stanzione, P., Martorana, A., Procopio, T., Sancesario, G., Stefani, A. (2008). In vivo electrophysiology of dopamine-denervated striatum: focus on the nitric oxide/cGMP signaling pathway. *Synapse*, 62, 409-420.
- Galvan, A., Devergnas, A., Wichmann, T. (2015). Alterations in neuronal activity in basal ganglia-thalamocortical circuits in the parkinsonian state. *Frontiers in Neuroanatomy*, 9.
- Garthwaite, J. (2008). Concepts of neural NO-mediated transmission. *European Journal Neuroscience*, 27, 2783-2802.
- Gerhard, A., Pavese, N., Hotton, G., Turkheimer, F., Es, M., Hammers, A., Brooks, D. J. (2006). In vivo imaging of microglial activation with [¹¹C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 21, 404-412.
- Gerfen, C. R., Baimbridge, K. G., Miller, J. J. (1985) The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 8780-8784.
- Gerfen, C. R., Herkenham, M., Thibault, J. (1987b). The neostriatal mosaic. II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *J. Neurosci*, 7, 3915-3934.
- Gerfen, C.R., and Young, W.S. (1988) Distribution of striatonigral and striatopallidal peptidergic neurons in both patch and matrix compartments: an in situ hybridization histochemistry and fluorescent retrograde tracing study. *Brain Res*, 460, 161-167.

- Gerfen, C. R., Engber, T. M., Mahan, L. C., Susel, Z., Chase, T. N., Monsma, F. J. Jr, Sibley, D. R. (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250, 1429-1432.
- Gerfen, C. R., Keefe, K. A., Gauda, E. B. (1995). D1 and D2 dopamine receptor function in the striatum: coactivation of D1- and D2-dopamine receptors on separate populations of neurons results in potentiated immediate early gene response in D1-containing neurons. *J Neurosci*, 15, 8167-8176.
- Gerfen, C. R. (2000). Dopamine-mediated gene regulation in models of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 47, 42-50.
- Gerfen, C. R., and Surmeier, D. J. (2011). Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosci*, 34, 441-466.
- Gerfen, C. R., Bolam, J. P. (2017). The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. In H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (2nd ed., pp. 3-32), London, Elsevier.
- Gibb, B. J., and Garthwaite, J. (2001). Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain. *Eur J Neurosci*, 13, 539-544.
- Gilman, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56, 615-649.
- Giorgi, M., D'Angelo, V., Esposito, Z., Nuccetelli, V., Sorge, R. (2008). Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms. *Eur J Neurosci*, 28, 941-950.
- Girasole, A. E., Lum, M.Y., Nathaniel, D., Bair-Marshall, C. J., Guenther, C. J., Luo, L., Kreitzer, A. C., Nelson, A. B. (2018). A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia. *Neuron*, 97, 787-795.
- Girault, J. A., Valjent, E., Caboche, J., Hervé, D. (2007). ERK2: a logical AND gate critical for drug-induced plasticity? *Curr Opin Pharmacol*, 7, 77-85.
- Glatt, C. E., and Snyder, S. H. (1993). Cloning and expression of an adenylyl cyclase localized to the corpus striatum. *Nature*, 361, 536-538.
- Goedert, M., Spillantini, M.G., Del Tredici, K., Braak, H. (2013). 100 years of Lewy pathology. *Nat Rev Neurol*, 9, 13-24.
- Gomes, M. Z., and Del Bel, E. A. (2003). Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. *Brain Res Bull*, 62, 107-115.
- González-Aparicio, R., and Moratalla, R. (2014). Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 62, 416-425.

- Gomes, M. Z., Raisman-Vozari, R., Del Bel, E. A (2008). A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxidopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain Res*, 1203, 160-169.
- Gomide, V. C., Silveira, G. A., Chadi, G. (2005). Transient and widespread astroglial activation in the brain after a striatal 6-OHDA-induced partial lesion of the nigrostriatal system. *Int J Neurosci*, 115, 99-117.
- González-Scarano, F., and Baltuch, G. (1999). Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci*, 22, 219-240.
- Graybiel, A.M. (1986). Neuropeptides in the basal ganglia. In: J. B., Martin and J. D., Barchas (Eds.), *Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric Disease*. Raven Press, New York, 135-161.
- Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., Kimura, M. (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265, 1826-1831.
- Graybiel, A. M., Canales, J. J., Capper-Loup, C. (2000). Levodopa-induced dyskinesias and dopamine-dependent stereotypies: a new hypothesis. *Trends Neurosci*, 23, 71-77.
- Greengard, P. (2001). The neurobiology of dopamine signaling. *Biosci Rep*, 21, 247-269.
- Griffith, O. W., and Stuehr, D. J. (1995). Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol*, 57, 707-734.
- Grillner, S., Robertson, B., Stephenson-Jones, M. (2013). The evolutionary origin of the vertebrate basal ganglia and its role in action selection. *J Physiol*, 591, 5425-5431.
- Griscavage, J. M., Fukuto, J. M., Komori, Y., Ignarro, L. J. (1994). Nitric oxide inhibits neuronal nitric oxide synthase by interacting with the heme prosthetic group. Role of tetrahydrobiopterin in modulating the inhibitory action of nitric oxide. *J Biol Chem*, 269, 21644-21649.
- Gumulka, S. W., Dinnendahl, V., Peters, H. D., Schönhöfer, P. S. (1976). Effects of dopaminergic stimulants on cyclic nucleotide levels in mouse brain in vivo. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 293, 75-80.
- Gupta, S. P., Yadav, S., Singhal, N. K., Tiwari, M. N., Mishra, S. K., Singh, M. P. (2014). Does Restraining Nitric Oxide Biosynthesis Rescue from Toxins- Induced Parkinsonism and Sporadic Parkinson's Disease? *Mol Neurobiol*, 49, 262-275.
- Greengard, P., Allen, P. B., Nairn, A. C. (1999). Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron*, 23, 435-447.
- Guzik, T. J., Korb, R., Adamek-Guzik, T. (2003). Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol*, 54, 469-487.

- Hagell, P., and Widner, H. (1999). Clinical rating of dyskinesias in Parkinson's disease: use and reliability of a new rating scale. *Mov Disord*, 14, 448-455.
- Hasbi, A., O'Dowd, B. F., George, S. R. (2010). Heteromerization of dopamine D2 receptors with dopamine D1 or D5 receptors generates intracellular calcium signaling by different mechanisms. *Curr Opin Pharmacol*, 10, 93-99.
- Hemish, J., Nakaya, N., Mittal, V., Enikolopov, G. (2003). Nitric oxide activates diverse signaling pathways to regulate gene expression. *J Biol Chem*, 278, 42321-42329.
- Henning, J., Strauss, U., Wree, A., Gimsa, J., Rolfs, A., Benecke, R., Gimsa, U. (2008). Differential astroglial activation in 6-hydroxydopamine models of Parkinson's disease. *Neurosci Res*, 62, 246-253.
- Henry, V., Paillé, V., Lelan, F., Brachet, P., Damier, P. (2009). Kinetics of microglial activation and degeneration of dopamine-containing neurons in a rat model of Parkinson disease induced by 6-hydroxydopamine. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68, 1092-1102.
- Hervé, D., Lévi-Strauss, M., Marey-Semper, I., Verney, C., Tassin, J. P., Glowinski, J., Girault, J. A. (1993). G(olf) and Gs in rat basal ganglia: possible involvement of G(olf) in the coupling of dopamine D1 receptor with adenylyl cyclase. *J Neurosci*, 13, 2237-2248.
- Hidaka, S., and Totterdell, S. (2001). Ultrastructural features of the nitric oxide synthase-containing interneurons in the nucleus accumbens and their relationship with tyrosine hydroxylase-containing terminals. *J. Comp. Neurol*, 431, 139-154.
- Higley, M. J., and Sabatini, B. L. (2010). Competitive regulation of synaptic Ca²⁺ influx by D2 dopamine and A2A adenosine receptors. *Nat Neurosci*, 13, 958-966.
- Hikosaka, O., Takikawa, Y., Kawagoe, R. (2000). Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiol. Rev.*, 80, 953-978.
- Hirsch, E. C., Hunot, S., Damier, P., Faucheux, B. (1998). Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol*, 44, 115-120.
- Hirsch, E. C., Breidert, T., Rousset, E., Hunot, S., Hartmann, A., Michel, P. P. (2003). The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 214-228.
- Hirsch, E. C., and Hunot, S. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*, 8, 382-397.
- Hyman, S. E., and Nestler, E. J. (1996). Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. *Am J Psychiatry*, 153, 151-162.
- Ho, G. P., Selvakumar, B., Mukai, J., Hester, L. D., Wang, Y., Gogos, J. A., Snyder, S. H. (2011). S-nitrosylation and S-palmitoylation reciprocally regulate synaptic targeting of PSD-95. *Neuron*, 71, 131-141.

- Hudson, T. Y., Corbett, J. A., Howlett, A. C., Klein, C. (2001). Nitric oxide regulates adenylyl cyclase activity in rat striatal membranes. *J Neurochem*, 77, 1279-1284.
- Hunot, S., Boissière, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1996). Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-363.
- Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P. P., Muriel, M. P., Ruberg, M., Faucheux, B. A., Agid, Y., Hirsch, E. C. (1997). Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 7531-7536.
- Huot, P., and Fox, S. H. (2013). The serotonergic system in motor and non-motor manifestations of Parkinson's disease. *Exp Brain Res*, 230, 463-476.
- Hwang, D. Y., Ardayfio, P., Kang, U. J., Semina, E. V., Kim, K. S. (2003). Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain Res Mol Brain Res*, 114, 123-131.
- Iadecola, C., and Gorelick, P. B. (2005). The Janus face of cyclooxygenase-2 in ischemic stroke: shifting toward downstream targets. *Stroke*, 36, 182-185.
- Ignarro, L. J., Barry, B. K., Gruetter, D. Y., Ohlstein, E. H., Gruetter, C. A., Kadowitz, P. J., Baricos, W. H. (1981). Selective alterations in responsiveness of guanylate cyclase to activation by nitroso compounds during enzyme purification. *Biochim Biophys Acta*, 673, 394-407.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 9265-9269.
- Inyushin, M. Y., Huertas, A., Kucheryavykh, Y. V., Kucheryavykh, L. Y., Tsydzik, V., Sanabria, P., Eaton, M. J., Skatchkov, S. N., Rojas, L. V., Wessinger, W. D. (2012). L-DOPA Uptake in Astrocytic Endfeet Enwrapping Blood Vessels in Rat Brain. *Parkinsons Dis*, 321406.
- Iravani, M. M., and Jenner, P. (2011). Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. *J Neural Transm (Vienna)*, 118, 1661-1690.
- Issy, A. C., Salum, C., Del Bel, E. A. (2009). Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. *Behav Brain Res*, 205, 475-481.
- Issy, A. C., Del Bel, E. A. (2014a). 7-Nitroindazole blocks the prepulse inhibition disruption and c-Fos increase induced by methylphenidate. *Behav Brain Res*, 262, 74-83.

- Issy, A. C., Pedrazzi, J. F., Yoneyama, B. H., Del-Bel, E. A. (2014b). Critical role of nitric oxide in the modulation of prepulse inhibition in Swiss mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 231, 663-672.
- Issy, A. C., Dos-Santos-Pereira, M., Pedrazzi, J. F. C., Kubrusly, R. C. C., Del-Bel, E. (2018). The role of striatum and prefrontal cortex in the prevention of amphetamine-induced schizophrenia-like effects mediated by nitric oxide compounds. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 86, 353-362.
- Itokawa, K., Ohkuma, A., Araki, N., Tamura, N., Shimazu, K. (2006). Effect of l-DOPA on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice. *Neurosci. Lett*, 402, 142-144.
- Ivankovich, A. D., Miletich, D. J., Tinker, J. H. (1978). Sodium nitroprusside: Metabolism and general considerations. *Int Anesthesiol Clin*, 16, 1-29.
- Jankovic, J., and Aguilar, L. G. (2008). Current approaches to the treatment of Parkinson's disease. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 4, 743-757.
- Jenner, P. (2003). The MPTP-treated primate as a model of motor complications in PD: primate model of motor complications. *Neurology*, 61, 4-11.
- Jenner, P. (2004). Avoidance of dyskinesia: preclinical evidence for continuous dopaminergic stimulation. *Neurology*, 62, 47-55.
- Jenner, P. (2008). Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci*, 9, 665-677.
- Jiao, Y., Sun, Z., Lee, T., Fusco, F. R., Kimble, T. D., Meade, C. A., Cuthbertson, S., Reiner, A. (1999). A simple and sensitive antigen retrieval method for free-floating and slide-mounted tissue sections. *J Neurosci Methods*, 93, 149-162.
- Johnson, C. (1928). Mechanisms of actions and toxicity of nitroprusside. *Exp Biol Med*, 26: 2.
- Juorio, A. V., Li, X. M., Walz, W., Paterson, I. A. (1993). Decarboxylation of L-dopa by cultured mouse astrocytes. *Brain Res*, 29, 306-309.
- Kawaguchi, Y., Wilson, C.J., Emson, P.C. (1990). Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin. *J. Neurosci*, 10, 3421-3438.
- Kawaguchi, Y., and Kubota, Y. (1993). Correlation of physiological subgroupings of nonpyramidal cells with parvalbumin- and calbindinD28k-immunoreactive neurons in layer V of rat frontal cortex. *J. Neurophysiol*, 70, 387-396.
- Kebabian, J. W., and Calne, D. B. (1979). Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93-96.

- Kelleher, R. J., Govindarajan, A., Jung, H. I., Kang, H., Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 116, 467–479.
- Kelz, M. B., Chen, J., Carlezon, W. A. Jr., Whisler, K., Gilden, L., Beckmann, A. M., Steffen, C., Zhang, Y. J., Marotti, L., Self, D. W., Tkatch, T., Baranauskas, G., Surmeier, D. J., Neve, R. L., Duman, R. S., Picciotto, M. R., Nestler, E. J. (1999). Expression of the transcription factor deltaFosB in the brain controls sensitivity to cocaine. *Nature*, 401, 272-276.
- Kandel, E. R. (2012). The molecular biology of memory: cAMP, PKA, CRE, CREB-1, CREB-2, and CPEB. *Molecular Brain*, 5:14
- Kemp, J. M., and Powell, T.P. (1971). The synaptic organization of the caudate nucleus: *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 262, 403-412.
- Kim, S. O., Merchant, K., Nudelman, R., Beyer, W. F. Jr., Keng, T., DeAngelo, J., Hausladen, A., Stamler, J. S. (2002). OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell*, 109, 383–396.
- Kish, S. J., Shannak, K., Hornykiewicz, O. (1988). Uneven pattern of dopamine loss in the striatum of patients with idiopathic Parkinson's disease. *N. Engl. J. Med*, 318, 876–880.
- Kiss, J. P. (2000). Role of nitric oxide in the regulation of monoaminergic neurotransmission. *Brain Res. Bull*, 52, 459-466.
- Kiss, J. P., and Vizi, E. S. (2001). Nitric oxide: a novel link between synaptic and non-synaptic transmission. *Trends Neuroscience*, 24, 211-215.
- Kita, H. (1993). GABAergic circuits of the striatum. *Prog Brain Res*, 99, 51–72.
- Kita, H., Kosaka, T., Heizmann, C.W. (1990). Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat neostriatum: a light and electron microscopic study. *Brain Res*, 536, 1-15.
- Kopincová, J., Púzserová, A., Bernátová, I. (2011). Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. *Interdiscip Toxicol*, 4, 63-68.
- Knott, C., Stern, G., Wilkin, G. P. (2000). Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Mol Cell Neurosci*, 16, 724-739.
- Konradi, C., Leveque, J. C., Hyman, S. E. (1996). Amphetamine and dopamine-induced immediate early gene expression in striatal neurons depends on postsynaptic NMDA receptors and calcium. *J Neurosci*, 16, 4231-4239.
- Kostowski, W. (1976). Predicting the psychotropic properties of new drugs on the basis of drug screening in animals. *Psychiatr Pol*, 10, 33-43.

- Kravitz, A. V., Benjamin, S. F., Parker, P. R. L., Kay, K., Thwin, M. T., Deisseroth, K., Kreitzer, A. C. (2010). Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466.
- Kreye, V. A., and Reske, S. N. (1982). Possible site of the in vivo disposition of sodium nitroprusside in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 320, 260-265.
- Krupinski, J., Coussen, F., Bakalyar, H. A., Tang, W. J., Feinstein, P. G., Orth, K., Slaughter, C., Reed, R. R., Gilman, A.G. (1989). Adenylyl cyclase amino acid sequence: possible channel- or transporter-like structure. *Science*, 244, 1558-1564.
- Kubota, Y., and Kawaguchi, Y. (1993). Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to patch and matrix compartments of rat neostriatum. *J Comp Neurol*, 332, 499–513.
- Kuroiwa, M., Bateup, H. S., Shuto, T., Higashi, H., Tanaka, M., Nishi, A. (2008). Regulation of DARPP-32 phosphorylation by three distinct dopamine D1-like receptor signaling pathways in the neostriatum. *J Neurochem*, 107, 1014-1026.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19, 312-318.
- Lebel, M., Chagniel, L., Bureau, G., Cyr, M. (2010). Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiol Dis*, 38, 59-67.
- Le Moine, C., Normand, E., Bloch, B. (1991). Phenotypical characterization of the rat striatal neurons expressing the D1 dopamine receptor gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88, 4205-4209.
- Lee, C. S., Cenci, M. A., Schulzer, M., Björklund, A. (2000). Embryonic ventral mesencephalic grafts improve levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Brain*, 123, 1365–1379.
- L'Episcopo, F., Tirolo, C., Caniglia, S., Testa, N., Serra, P. A., Impagnatiello, F., Morale, M. C., Marchetti, B. (2010). Combining nitric oxide release with anti-inflammatory activity preserves nigrostriatal dopaminergic innervation and prevents motor impairment in a 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease. *J Neuroinflammation*, 23, 7:83.
- Levandis, G., Bazzini, E., Armentero, M. T., Nappi, G., Blandini, F. (2008). Systemic administration of an mGluR5 antagonist, but not unilateral subthalamic lesion, counteracts L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis*, 29, 161-168.
- Liang, L., DeLong, M. R., Papa, S. M. (2008). Inversion of dopamine responses in striatal medium spiny neurons and involuntary movements. *J Neurosci*, 28, 7537-7547.
- Liberatore, G. T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A. S., Vila, M., McAuliffe, W. G., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Przedborski, S. (1999). Inducible

nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature medicine*, 5, 1403-1409.

Lin, D. T., Fretier, P., Jiang, C., Vincent, S. R. (2010). Nitric oxide signaling via cGMP-stimulated phosphodiesterase in striatal neurons. *Synapse*, 64, 460-466.

Linazasoro, G. (2005). New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends Pharmacol. Sci*, 26, 391-397.

Lindgren, H. S., Rylander, D., Ohlin, K. E., Lundblad, M., Cenci, M. A. (2007). The "motor complication syndrome" in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. *Behav Brain Res*, 177, 150-159.

Liu, D., Sammut, S., West, A. R., (2005b). Nitric oxide signaling modulates the responsiveness of striatal medium spiny neurons to electrical stimulation of the substantia nigra: striatal nitrenergic signaling. In: J. P., Bolam, C. A., Ingham, P. J., Magill (Eds.), *The Basal Ganglia VIII* (503-512), New York, Springer Science and Business Media.

Lonart, G., and Johnson, K. M. (1994). Inhibitory effects of nitric oxide on the uptake of [3H] dopamine and [3H] glutamate by striatal synaptosomes. *J. Neurochem*, 63, 2108-2117.

Lovinger, D. M., Tyler, E. C., Merritt, A. (1993). Short- and long-term synaptic depression in rat neostriatum. *J Neurophysiol*, 70, 1937-1949.

Lu, Y. F., Kandel, E. R., Hawkins, R. D. (1999). Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus. *J Neurosci*, 19, 10250-10261.

Lucas, K. A., Pitari, G. M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. P., Waldman, S. A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev*, 52, 375-414.

Luginger, E., Wenning, G. K., Bösch, S., Poewe, W. (2000). Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 15, 873-878.

Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 156-167.

Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M. A. (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of acinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *European Journal of Neuroscience*, 15, 120-132.

Lundblad, M., Vaudano, E., Cenci, M.A. (2003). Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem*, 84, 1398-1410.

- Lundblad, M., Picconi, B., Lindgren, H., Cenci, M. A. (2004). A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis*, 16, 110-123.
- Lundgaard, I., Osório, M. J., Kress, B. T., Sanggaard, S., Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*, 12, 161-173.
- Lust, W. D., Passonneau, J. V., Veech, R. L. (1973). Cyclic adenosine monophosphate, metabolites, and phosphorylase in neural tissue: a comparison a methods of fixation. *Science*, 181, 280-282.
- Maia, T.V., and Frank, M. J. (2011). From reinforcement learning models to psychiatric and neurological disorders. *Nat. Neurosci*, 14, 154-162.
- Maia, S., Arlicot, N., Vierron, E., Bodard, S., Vergote, J., Guilloteau, D., Chalon, S. (2012). Longitudinal and parallel monitoring of neuroinflammation and neurodegeneration in a 6-hydroxydopamine rat model of Parkinson's disease. *Synapse*, 66, 573-583.
- Maia-de-Oliveira, J. P., Lobão-Soares, B., Ramalho, T., Gavioli, E. C., Soares, V. P., Teixeira, L., Baker, G. B., Dursun, S. M., Hallak, J. E. (2015). Nitroprusside single-dose prevents the psychosis-like behavior induced by ketamine in rats for up to one week. *Schizophr Res*, 162, 211-215.
- Malenka, R. C., and Bear, M. F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*, 44, 5-21.
- Manson, A., Stirpe, P., Schrag, A. (2012). Levodopa- induced-dyskinesias clinical features, incidence, risk factors, management and impact on quality of life. *J. Parkinsons Dis*, 2, 189-198.
- Marletta, M. A. (1988). Mammalian synthesis of nitrite, nitrate, nitric oxide, and N-nitrosating agents. *Chem Res Toxicol*, 1, 249-257.
- Marsden, C. D. (1994). Problems with long-term levodopa therapy for Parkinson's disease. *Clinical Neuropharmacology*, 17, 32-44.
- Martins, T. J., Mumby, M. C., Beavo, J. A. (1982). Purification and characterization of a cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase from bovine tissues. *J Biol Chem*, 257, 1973-1979.
- Martinez, S. E., Beavo, J. A., Hol, W. G. (2002). GAF domains: two-billion-year-old molecular switches that bind cyclic nucleotides. *Mol Interv*, 2, 317-323.
- Mayer, B., John, M., Böhme, E. (1990). Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum: Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS letters*, 277, 215-219.

- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., McGeer, E. G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-1291.
- McVey, M., Hill, J., Howlett, A., Klein, C. (1999). Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide. *J Biol Chem*, 274, 18887-18892.
- Menniti, F. S., Faraci, W. S., Schmidt, C. J. (2006). Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 660-670.
- Metman, L. V., Del Dotto, P., LePoole, K., Konitsiotis, S., Fang, J., Chase, T. N. (1999). Amantadine for levodopa-induced dyskinesias: a 1-year follow-up study. *Arch Neurol*, 56, 1383-1386.
- Michel, P. P., Hirsch, E. C., Hunot, S. (2016). Understanding Dopaminergic Cell Death Pathways in Parkinson Disease. *Neuron*, 90, 675-691.
- Miller, M. R., and Megson, I. L. (2007). Recent developments in nitric oxide donor drugs. *Br J Pharmacol*, 151, 305-321.
- Mink, J. W., and Thach, W. T. (1993). Basal ganglia intrinsic circuits and their role in behavior. *Curr Opin Neurobiol*, 3, 950-957.
- Mink, J.W. (1996) The basal ganglia: focused selection and inhibition of competing motor programs. *Prog. Neurobiol*, 50, 381-425.
- Mitkovski, M., Padovan-Neto, F. E., Raisman-Vozari, R., Ginestet, L., daSilva, C. A., Del-Bel, E. A. (2012). Investigations into potential extrasynaptic communication between the dopaminergic and nitrergic systems. *Front Physiol*, 3, 372.
- Mizuno, M., Yamada, K., Maekawa, N., Saito, K., Seishima, M., Nabeshima, T. (2002). CREB phosphorylation as a molecular marker of memory processing in the hippocampus for spatial learning. *Behav Brain Res*, 133, 135-141.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T. (1994). Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neurosci Lett*, 180, 147-150.
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Narabayashi, H., Riederer, P., Nagatsu, T. (1995). Transforming growth factor-beta 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 193, 129-132.
- Mogi, M., Kondo, T., Mizuno, Y., Nagatsu, T. (2007). p53 protein, interferon-gamma, and NF-kappaB levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neurosci Lett*, 414, 94-97.
- Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med*, 329, 2002-2012.

- Mons, N., Yoshimura, M., Cooper, D. M. (1993). Discrete expression of Ca^{2+} /calmodulin-sensitive and Ca^{2+} -insensitive adenylyl cyclases in the rat brain. *Synapse*, 14, 51-59.
- Mons, N., and Cooper, D. M. (1994). Selective expression of one Ca^{2+} -inhibitable adenylyl cyclase in dopaminergically innervated rat brain regions. *Brain Res Mol Brain Res*, 22, 236-244.
- Mons, N., and Cooper, D. M. (1995). Adenylate cyclases: critical foci in neuronal signaling. *Trends Neurosci*, 18, 536-542.
- Mons, N., Decorte, L., Jaffard, R., Cooper, D. M. (1998). Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sci*, 62, 1647-1652.
- Morello, M., Reiner, A., Sancesario, G., Karle, E. J., Bernardi, G. (1997). Ultrastructural study of nitric oxide synthase-containing striatal neurons and their relationship with parvalbumin-containing neurons in rats. *Brain Res*, 776, 30-39.
- Morin, N., and Di Paolo, T. (2014). Pharmacological Treatments Inhibiting Levodopa-Induced Dyskinesias in MPTP-Lesioned Monkeys: Brain Glutamate Biochemical Correlates. *Front Neurol*, 144.
- Mukherjee, P., Cinelli, M. A., Kang, S., Silverman, R. B. (2014). Development of nitric oxide synthase inhibitors for neurodegeneration and neuropathic pain. *Chem. Soc. Rev*, 43, 6814-6838.
- Mulas, G., Espa, E., Fenu, S., Spiga, S., Cossu, G., Pillai, E., Carboni, E., Simbula, G., Jadzic, D., Angius, F., Spolitu, S., Batetta, B., Lecca, D., Giuffrida, A., Carta, A. R. (2016). Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous l-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 286, 83-92.
- Murad, F. (2006). Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med*, 355, 2003-2011.
- Mustafa, A. K., Kumar, M., Selvakumar, B., Ho, G. P., Ehmsen, J. T., Barrow, R. K., Amzel, L. M., Snyder, S. H. (2007). Nitric oxide S-nitrosylates serine racemase, mediating feedback inhibition of D-serine formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 2950-2955.
- Nambu, A., Takada, M., Inase, M., Tokuno, H. (1996). Dual somatotopical representations in the primate subthalamic nucleus: evidence for ordered but reversed body-map transformations from the primary motor cortex and the supplementary motor area. *J Neurosci*, 16, 2671-2683.
- Nambu, A., Tokuno, H., Hamada. (2000). Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *J Neurophysiol*, 84, 289-300.
- Nathan, C., and Xie, Q. W. (1994a). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78, 915-918.

- Nathan, C., and Xie, Q. W. (1994b). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem*, 269, 13725-13728.
- Nayak, D., Roth, T. L., McGavern, D. B. (2014). Microglia development and function. *Annu. Rev. Immunol*, 32, 367-402.
- Nestler, E. J., Barrot, M., Self, D. W. (2001). DeltaFosB: A sustained molecular switch for addiction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 98, 11042–11046.
- Nestler, E. J. (2015). Δ FosB: A transcriptional regulator of stress and antidepressant responses. *Eur. J. Pharmacol*, 753, 66–72.
- Nicholas, A. P. (2008) Striatal histone modifications in models of levodopa-induced dyskinesia. *J. Neurochem*, 106, 486–494.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308, 1314-1318.
- Nishi, A., Kuroiwa, M., Shuto, T. (2011). Mechanisms for the modulation of dopamine d(1) receptor signaling in striatal neurons. *Front Neuroanat*, 18.
- Nogawa, S., Forster, C., Zhang, F., Nagayama, M., Ross, M. E., Iadecola, C. (1998). Interaction between inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 after cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 10966–10971.
- Nunes, I., Tovmasian, L. T., Silva, R. M., Burke, R. E., Goff, S. P. (2003). Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 4245-4250.
- Nutt, J.G., and Fellman, J.H. (1984). Pharmacokinetics of levodopa. *Clin Neuropharmacol*, 7, 35-49.
- Nutt, J. G. (1990). Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology*, 40, 340–345.
- O'Banion, M. K. (1999). Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol*, 13, 45-82.
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross, G. W., Langston, J. W., Klein, C., Bonifati, V., Jankovic, J., Lozano, A. M., Deuschl, G., Bergman, H., Tolosa, E., Rodriguez-Violante, M., Fahn, S., Postuma, R. B., Berg, D., Marek, K., Standaert, D. G., Surmeier, D. J., Olanow, C. W., Kordower, J. H., Calabresi, P., Schapira, A. H. V., Stoessl, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Mov Disord*. 32, 1264-1310.

- Oertel, W.H. and Mugnaini, E. (1984). Immunocytochemical studies of GABAergic neurons in rat basal ganglia and their relations to other neuronal systems. *Neurosci. Lett*, 47, 233-238.
- Oh, J. D., Chartisathian, K., Ahmed, S. M., Chase, T. N. (2003). Cyclic AMP responsive element binding protein phosphorylation and persistent expression of levodopa-induced response alterations in unilateral nigrostriatal 6-OHDA lesioned rats. *J Neurosci Res*, 72, 768-780.
- Olanow, C.W., Kieburtz, K., Rascol, O., Poewe, W., Schapira, A. H., Emre, M., Nissinen, H., Leinonen, M., Stocchi, F. (2013). Factors predictive of the development of levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. *Mov. Disord*, 28, 1064-1071.
- Olsson, M., Nikkhah, G., Bentlage, C., Bjorklund, A. (1995). Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: Differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci*, 15, 3863-387.
- Olesen, S. P., Drejer, J., Axelsson, O., Moldt, P., Bang, L., Nielsen-Kudsk, J. E., Busse, R., Mülsch, A. (1998). Characterization of NS 2028 as a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase. *Br J Pharmacol*, 123, 299-309.
- Ondracek, J. M., Dec, A., Hoque, K. E., Lim, S. A., Rasouli, G. (2008). Feed forward excitation of striatal neuron activity by frontal cortical activation of nitric oxide signaling in vivo. *Eur J Neurosci*, 27, 1739-1754.
- Oorschot, D. E. (1996). Total number of neurons in the neostriatal, pallidal, subthalamic, and substantia nigral nuclei of the rat basal ganglia: a stereological study using the Cavalieri and optical disector methods. *J. Comp. Neurol*, 366, 580-599.
- Ota, K. T., Pierre, V. J., Ploski, J. E., Queen, K., Schafe, G. E. (2008). The NO-cGMP-PKG signaling pathway regulates synaptic plasticity and fear memory consolidation in the lateral amygdala via activation of ERK/MAP kinase. *Learn Mem*, 15, 792-805.
- Padovan-Neto F. E., Echeverry, M. B., Tumas, V., Del-Bel, E. A. (2009). Nitric oxide synthase inhibition attenuates l-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 159, 927-935.
- Padovan-Neto, F. E., Echeverry, M. B., Chiavegatto, S., Del-Bel, E. A. (2011). Nitric oxide synthase inhibitor improves de novo and longterm l-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. *Frontiers in Systems Neuroscience*, v. 5.
- Padovan-Neto, F. E., Ferreira, N. R., de Oliveira-Tavares, D., de Aguiar, D., da Silva, C. A., Raisman-Vozari, R., Del Bel, E. (2013). Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. *Neurosci Lett*, 541, 126-131.
- Padovan-Neto, F. E., Cavalcanti-Kiwiatkovski, R., Carolino, R. O., Anselmo-Franci, J., Del Bel, E. A. (2015). Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on

the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology*, 89, 87-99.

Padovan-Neto, F. E., and West, A. R. (2017). Regulation of Striatal Neuron Activity by Cyclic Nucleotide Signaling and Phosphodiesterase Inhibition: Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. *Adv Neurobiol*, 17, 257-283.

Page, I. H., Corcoran, A. C., Dustan, H. P., Koppanyi, T. (1955). Cardiovascular actions of sodium nitroprusside in animals and hypertensive patients. *Circulation*, 11, 188-198.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.

Papa, S. M., Engber, T. M., Kask, A. M., Chase, T. N. (1994). Motor fluctuations in L-DOPA treated parkinsonian rats-relation to lesion extent treatment duration. *Brain Research*, 662, 69-74.

Park, D. J., and West, A. R. (2009). Regulation of striatal nitric oxide synthesis by local dopamine and glutamate interactions. *J. Neurochem*, 111, 1457-1465.

Pascoli, V., Besnard, A., Hervé, D., Pagès, C., Heck, N., Girault, J. A., Caboche, J., Vanhoutte, P. (2011). Cyclic adenosine monophosphate-independent tyrosine phosphorylation of NR2B mediates cocaine-induced extracellular signal-regulated kinase activation. *Biol Psychiatry*, 69, 218-227.

Pasik, P., Pasik, T., Holstein, G.R., Hámori, J. (1988). GABAergic elements in the neuronal circuits of the monkey neostriatum: a light and electron microscopic immunocytochemical study. *J. Comp. Neurol*, 270, 157-170.

Pawlak, V., and Kerr, J. N. (2008). Dopamine receptor activation is required for corticostriatal spike-timing-dependent plasticity. *J Neurosci*, 28, 2435-2446.

Pavon, N., Martin, A. B., Mendiola, A., Moratalla, R. (2006). ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biological Psychiatry*, 59, 64-74.

Paxinos, G., and Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed., Academic Press, San Diego.

Pearce, R. K., Heikkilä, M., Lindén, I. B., Jenner, P. (2001). L-dopa induces dyskinesia in normal monkeys: behavioural and pharmacokinetic observations. *Psychopharmacology (Berl)*, 156, 402-409.

Pérez-Sala, D., and Lamas, S. (2001). Regulation of cyclooxygenase-2 expression by nitric oxide in cells. *Antioxid Redox Signal*, 3, 231-248.

Piffl, C., Nanoff, C., Schingnitz, G., Schütz, W., Hornykiewicz, O. (1992). Sensitization of dopamine-stimulated adenylyl cyclase in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated rhesus monkeys and patients with idiopathic Parkinson's disease. *J Neurochem*, 58, 1997-2004.

- Picconi, B., Pisani, A., Centonze, D., Battaglia, G., Storto, M., Nicoletti, F., Bernardi, G., Calabresi, P. (2002). Striatal metabotropic glutamate receptor function following experimental parkinsonism and chronic levodopa treatment. *Brain*, 125, 2635-2645.
- Picconi, B., Centonze, D., Hakansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M. A., Calabresi, P. (2003). Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Neurosci*, 6, 501-506.
- Picconi, B., Paillé, V., Ghiglieri, V., Bagetta, V., Barone, I., Lindgren, H. S., Bernardi, G., Cenci, M. A., Calabresi, P. (2008). L-DOPA dosage is critically involved in dyskinesia via loss of synaptic depotentiation. *Neurobiol Dis*, 29, 327-335.
- Picconi, B., Bagetta, V., Ghiglieri, V., Paillé, V., Di Filippo, M., Pendolino, V., Tozzi, A., Giampà, C., Fusco, F.R., Sgobio, C., Calabresi, P. (2011). Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain*, 134, 375-387.
- Pierucci, M., Galati, S., Valentino, M., Di Matteo, V., Benigno, A., Pitruzzella, A., Muscat, R., Di Giovanni, G. (2011). Nitric oxide modulation of the basal ganglia circuitry: Therapeutic implication for Parkinson's disease and other motor disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 10, 777-791.
- Pinheiro, L. C., Ferreira, G. C., Vilalva, K. H., Toledo, J. C., Tanus-Santos, J. E. (2018). *Contrasting effects of low versus high ascorbate doses on blood pressure responses to oral nitrite in L-NAME-induced hypertension. Nitric Oxide*, 74, 65–73.
- Playfair, L. (1849). On the nitroprusside: A new class of salts. *Philos Trans R Soc Lond*, 139: 41.
- Pogun, S., and Kuhar, M. J. (1994). Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 738, 305-315.
- Polito, M., Klarenbeek, J., Jalink, K., Paupardin-Tritsch, D., Vincent, P., Castro, L. R. (2013). The NO/cGMP pathway inhibits transient cAMP signals through the activation of PDE2 in striatal neurons. *Front Cell Neurosci*, 18, 7:211.
- Puerta, E., Hervias, I., Goñi-Allo, B., Lasheras, B., Jordan, J., Aguirre, N. (2009). Phosphodiesterase 5 inhibitors prevent 3,4-methylenedioxymethamphetamine-induced 5-HT deficits in the rat. *J Neurochem*, 108, 755-766.
- Putterman, D. B., Munhall, A. C., Kozell, L. B., Belknap, J. K., Johnson, S. W. (2007). Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther*, 323, 277-284.
- Prast, H., and Philippu, A. (2001). Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog. Neurobiol*, 64, 51-68.
- Rangel-Barajas, C., Silva, I., López-Santiago, L. M., Aceves, J., Erlij, D., Florán, B. (2011). L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-

regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. *Neurobiol Dis*, 41, 51-61.

Ransohoff, R.M., and Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol*, 27, 119-145.

Rao, A. S., Bodenheimer, R. E., Davis, T.L., Li, R., Voight, C., Dawant, B. M. (2008). Quantifying drug induced dyskinesia in Parkinson's disease patients using standardized videos. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*, 1769-1772.

Ravenscroft, P., Chalon, S., Brotchie, J. M., Crossman, A. R. (2004). Ropinirole versus L-DOPA effects on striatal opioid peptide precursors in a rodent model of Parkinson's disease: implications for dyskinesia. *Exp Neurol*, 185, 36-46.

Repaske, D. R., Corbin, J. G., Conti, M., Goy, M. F. (1993). A cyclic GMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase gene is highly expressed in the limbic system of the rat brain. *Neuroscience*, 56, 673-686.

Rivera, A., Alberti, I., Martin, A. B., Narvaez, J. A., de la, C. A., Moratalla, R. (2002). Molecular phenotype of rat striatal neurons expressing the dopamine D5 receptor subtype. *Eur. J. Neurosci*, 16, 2049-2058.

Rylander, D., Recchia, A., Mela, F., Dekundy, A., Danysz, W., Cenci, M. A. (2009). Pharmacological modulation of glutamate transmission in a rat model of l-dopa-induced Dyskinesia: Effects on motor behavior and striatal nuclear signaling. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 330, 227-235.

Redgrave, P., Prescott, T.J., Gurney, K. (1999). The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience*, 89, 1009-1023.

Reier, P. J., and Houle, J. D. (1988). The glial scar: its bearing on axonal elongation and transplantation approaches to CNS repair. *Adv Neurol*, 47, 87-138.

Ribak, C.E., Vaughn, J.E., Roberts, E. (1979). The GABA neurons and their axon terminals in rat corpus striatum as demonstrated by GAD immunocytochemistry. *J. Comp. Neurol*, 187, 261-283.

Robelet, S., Melon, C., Guillet, B., Salin, P., Kerkerian-Le Golf, L. (2004). Chronic L-DOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*, 1255-1266.

Robertson, H. A., Peterson, M. R., Murphy, K., Robertson, G. S. (1989). D1-dopamine receptor agonists selectively activate striatal c-fos independent of rotational behaviour. *Brain Res*, 503, 346-349.

Robertson, G. S., Vincent, S. R., Fibiger, H. C. (1990). Striatonigral projection neurons contain D1 dopamine receptor-activated c-fos. *Brain Res*, 523, 288-290.

Robertson, G.S., and Fibiger, H.C. (1992). Neuroleptics increase c-fos expression in the forebrain: contrasting effects of haloperidol and clozapine. *Neuroscience*, 46, 315-328.

- Roy, A., Fung, Y. K., Liu, X., Pahan, K. (2006). Up-regulation of microglial CD11b expression by nitric oxide. *J Biol Chem*, 281, 14971-14980.
- Rylander, D., Iderberg, H., Li, Q., et al. (2010). A mGluR5 antagonist under clinical development improves L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats and monkeys. *Neurobiol Dis*, 39, 352-361.
- Sahach, V. F., Baziliuk, O. V., Oleshko, M. M., Kotsiuruba, O. V., Bukhanevych, O. M., Appenzeller, O. (2000). The nitric oxide system in a chronic deficiency of mesostriatal dopamine: the action of nitroglycerin. *Fiziol Zh*, 46, 55-63.
- Salum, C., Guimarães, F. S., Brandão, M. L., Del Bel, E. A. (2006). Dopamine and nitric oxide interaction on the modulation of prepulse inhibition of the acoustic startle response in the Wistar rat. *Psychopharmacology (Berl)*, 185, 133-141.
- Salum, C., Issy, A. C., Brandão, M. L., Guimarães, F. S., Bel, E. A. (2011). Nitric oxide modulates dopaminergic regulation of prepulse inhibition in the basolateral amygdala. *J Psychopharmacol*, 25, 1639-1648.
- Sammur, S., Dec, A., Mitchell, D., Linardakis, J., Ortiguela, M., West, A. R. (2006). Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a neuronal NOS and a dopamine D(1/5) receptor-dependent mechanism. *Neuropsychopharmacol*, 493-505.
- Sammur, S., Bray, K. E., West, A. R. (2007a). Dopamine D(2) receptor-dependent modulation of striatal NO synthase activity. *Psychopharmacology (Berlin)*, 191, 793-803.
- Sammur, S., Threlfell, S., West, A. R. (2010). Nitric oxide-soluble guanylyl cyclase signaling regulates corticostriatal transmission and short-term synaptic plasticity of striatal projection neurons recorded in vivo. *Neuropharmacology*, 58, 624-631.
- Sanchez, J. J., Abreu, P., Gonzalez, M. C. (2002). Sodium nitroprusside stimulates L-DOPA release from striatal tissue through NO and Cgmp. *European Journal of Pharmacology*, 438, 79-83.
- Sancesario, G., Morello, M., Reiner, A., Giacomini, P., Massa, R., Schoen, S., Bernardi, G. (2000). Nitroergic neurons make synapses on dual-input dendritic spines of neurons in the cerebral cortex and the striatum of the rat: implication for a postsynaptic action of nitric oxide. *Neuroscience*, 99, 627-642.
- Sancesario, Giorgi, G. M., D'Angelo, V., Modica, A., Martorana, A., Morello, M., Bengtson, C. P., Bernardi, G. (2004). Down-regulation of nitroergic transmission in the rat striatum after chronic nigrostriatal deafferentation. *Eur J Neurosci*, 20, 989-1000.
- Sanders, L.H., and Greenamyre, J. T. (2013). Oxidative damage to macromolecules in human Parkinson disease and the rotenone model. *Free Radic. Biol. Med*, 62, 111-120.
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J. A., Hervé, D., Greengard, P., Fisone, G. (2007). Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and

extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci*, 27, 6995-7005.

Santini, E., Valjent, E., Fisone, G. (2008). Parkinson's disease: levodopa-induced dyskinesia and signal transduction. *FEBS J*, 275, 1392-1399.

Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E., Fisone, G. (2009). Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Sci Signal*, 2.

Santini, E., Sgambato-Faure, V., Li, Q., Savasta, M., Dovero, S., Fisone, G., Bezard, E. (2010). Distinct changes in cAMP and extracellular signal-regulated protein kinase signalling in L-DOPA-induced dyskinesia. *PLoS One*, 5, e12322.

Schiess, M. (2003). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs protect against Parkinson neurodegeneration: can an NSAID a day keep Parkinson disease away? *Arch Neurol*, 60, 1043-1044.

Schulz, J. B., Matthews, R. T., Klockgether, T., Dichgans, J., Beal, M. F. (1997). The role of mitochondrial dysfunction and neuronal nitric oxide in animal models of neurodegenerative diseases. *Mol Cell Biochem*, 174, 193-197.

Saavedra-López, R., Casanova, P. V., Cribaro, G. P., Barcia, C. (2017). Neuroinflammation in Movement Disorders. In H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (2nd ed., pp. 3-32), London, Elsevier.

Schmidt, H. H., e Murad, F. (1991). Purification and characterization of a human NO synthase. *Biochemical and biophysical research communications*, 181, 1372-1377.

Schwartz, M., and Shechter, R. (2010). Systemic inflammatory cells fight off neurodegenerative disease. *Nat. Rev. Neurol*, 6, 405-410.

Shen, W., Flajolet, M., Greengard, P., Surmeier, D. J. (2008). Dichotomous dopaminergic control of striatal synaptic plasticity. *Science*, 321, 848-851.

Siuciak, J. A., Chapin, D. S., Harms, J. F., Lebel, L. A., McCarthy, S. A., Chambers, L., Shrikhande, A., Wong, S., Menniti, F. S., Schmidt, C. J. (2006). Inhibition of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: a novel approach to the treatment of psychosis. *Neuropharmacology*, 51, 386-396.

Sgambato-Faure, V., Buggia, V., Gilbert, F., Levesque, D., Benabid, A. L., Berger, F. (2005). Coordinated and spatial upregulation of arc in striatonigral neurons correlates with L-dopa-induced behavioral sensitization in dyskinetic rats. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*, 64, 936-947.

Simpson, J. N., and McGinty, J. F. (1995). Forskolin induces preproenkephalin and preprodynorphin mRNA in rat striatum as demonstrated by in situ hybridization histochemistry. *Synapse*, 19, 151-159.

- Singh, A., Liang, L., Kaneoke, Y., Cao, X., Papa, S. M. (2015). Dopamine regulates distinctively the activity patterns of striatal output neurons in advanced parkinsonian primates. *J Neurophysiol*, 113, 1533-1544.
- Siuciak, J. A., McCarthy, S. A., Chapin, D. S., Fujiwara, R. A., James, L. C., Williams, R. D., Stock, J. L., McNeish, J. D., Strick, C. A., Menniti, F. S., Schmidt, C. J. (2006). Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology*, 51, 374-385.
- Soghomonian, J. J. (2006). L-DOPA-induced dyskinesia in adult rats with a unilateral 6-OHDA lesion of dopamine neurons is paralleled by increased c-fos gene expression in the subthalamic nucleus. *Eur J Neurosci*, 23, 2395-2403.
- Solís, O., Espadas, I., Del-BeL, E. A., Moratalla, R. (2015). Nitric oxide synthase inhibition decreases l-DOPA-induced-dyskinesia-and the expression of striatal molecular markers in Pitx3(-/-) aphakia mice. *Neurobiol Dis*, 73, 49-59.
- Smith, Y., and Parent, A. (1986). Neuropeptide Y-immunoreactive neurons in the striatum of cat and monkey: morphological characteristics, intrinsic organization and co-localization with somatostatin. *Brain Res*, 372, 241-252.
- Smith, Y., Parent, A., Seguela, P., Descarries, L. (1987). Distribution of GABA-immunoreactive neurons in the basal ganglia of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *J. Comp. Neurol*, 259, 50-64.
- Smith, J. N., and Dasgupta, T. P. (2001). Mechanisms of nitric oxide release from nitrovasodilators in aqueous solution: reaction of the nitroprusside ion ($[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]^{2-}$) with L-ascorbic acid. *J Inorg Biochem*, 87, 165-173.
- Snyder, S. H., and Ferris, C. D. (2000). Novel neurotransmitters and their neuropsychiatric relevance. *Am J Psychiatry*, 157, 1738-1751.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638 -647.
- Sofroniew, M. V., and Vinters, H. V. (2010.) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119, 7-35.
- Somogyi, P., Bolam, J.P., Smith, A.D. (1981). Monosynaptic cortical input and local axon collaterals of identified striatonigral neurons. A light and electron microscopic study using the Golgi-peroxidase transport-degeneration procedure. *J. Comp. Neurol*. 195, 567-584.
- Stamler, J. S. (1994). Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, 78, 931-936.
- Standaert, D., and Galanter, J. M. (2009). Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica. In D. E., Golan, A. H., Tashjian, E. J., Armstrong, A. W., Armstrong (Eds.) *Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatologia da Farmacoterapia*, (pp. 166-185), Rio de Janeiro, Nova Guanabara.

- Stefani, A., Fedele, E., Galati, S., Pepicelli, O., Frasca, S., Pierantozzi, M., Peppe, A., Brusa, L., Orlacchio, A., Hainsworth, A. H., Gattoni, G., Stanzione, P., Bernardi, G., Raiteri, M., Mazzone, P. (2005). Subthalamic stimulation activates internal pallidus: evidence from cGMP microdialysis in PD patients. *Ann. Neurol*, 57, 448-452.
- St-Hilaire, M., Landry, E., Levesque, D., Rouillard, C. (2005). Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiol. Dis*, 20, 450-460.
- Stone, J. M., Morrison, P. D., Koychev, I., Gao, F., Reilly, T. J., Kolanko, M., Mohammadinasab, A., Kapur, S., McGuire, P. K. (2016). The effect of sodium nitroprusside on psychotic symptoms and spatial working memory in patients with schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Psychol Med*, 46, 3443-3450.
- Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Gross, S. S., Thiel, B. A., Levi, R., Nathan, C. F. (1989). Synthesis of nitrogen oxides from L-arginine by macrophage cytosol: requirement for inducible and constitutive components. *Biochem Biophys Res Commun*, 161, 420-426.
- Stuehr, D. J., Kwon, N. S., Nathan, C. F., Griffith, O. W., Feldman, P. L., Wiseman, J. (1991). N omega-hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* 266, 6259-6263.
- Stuehr, D. J., Wei, C. C., Santolini, J., Wang, Z., Aoyagi, M., Getzoff, E. D. (2004). Radical reactions of nitric oxide synthases. *Biochem. Soc. Symp*, 39-49.
- Sulzer, D. (2007). Multiple hit hypotheses for dopamine neuron loss in Parkinson's disease. *Trends Neurosci*, 30, 244-250.
- Sun, D., and Jakobs, T. C. (2012). Structural remodeling of astrocytes in the injured CNS. *Neuroscientist*, 18, 567-588.
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J. A., Nairn, A. C., Greengard, P. (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 269-296.
- Stipanovich, A., Valjent, E., Matamalas, M., Nishi, A., Ahn, J. H., Maroteaux, M., Bertran-Gonzalez, J., Brami-Cherrier, K., Enslen, H., Corbillé, A. G., Filhol, O., Nairn, A. C., Greengard, P., Hervé, D., Girault, J. A. (2008). A phosphatase cascade by which rewarding stimuli control nucleosomal response. *Nature*, 453, 879-884.
- Swierkosz, T. A., Mitchell, J. A., Tomlinson, A., Botting, R. M., Warner, T. D., Vane, J. R. (1994). Relationship between different isoforms of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in various cell types. *Pol J Pharmacol*, 46, 587-592.
- Takuma, K., Tanaka, T., Takahashi, T., Hiramatsu, N., Ota, Y., Ago, Y., Matsuda, T. (2012). Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *Eur J Pharmacol*, 683, 166 - 173.

- Tani, M., Glabinski, A. R., Tuohy, V. K., Stoler, M. H., Estes, M. L., Ransohoff, R. M. (1996). In situ hybridization analysis of glial fibrillary acidic protein mRNA reveals evidence of biphasic astrocyte activation during acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*, 148, 889-896.
- Tansey, M. G., and Goldberg, M. S. (2010). Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. *Neurobiol Dis*, 37, 510-518.
- Tao, Y. P., Najafi, L., Shipley, S., Howlett, A., Klein, C. (1998). Effects of nitric oxide on adenylyl cyclase stimulation in N18TG2 neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 286, 298-304.
- Taskiran, D., Kutay, F. Z., Pogun, S. (2003). Effect of carbon monoxide on dopamine and glutamate uptake and cGMP levels in rat brain. *Neuropsychopharmacology*, 28, 1176-1181.
- Taylor, J. L., Bishop, C., Walker, P. D. (2005). Dopamine D1 and D2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 81, 887-893.
- Teismann, P., Tieu, K., Choi, D. K., Wu, D. C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. (2003). Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5473-5478.
- Tekumalla, P. K., Calon, F., Rahman, Z., Birdi, S., Rajput, A. H., Hornykiewicz, O., Di Paolo, T., Bédard, P. J., Nestler, E. J. (2001). Elevated levels of DeltaFosB and RGS9 in striatum in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry*, 50, 813-816.
- Tepper, J. M., Abercrombie, E. D., Bolam, J. P. (2007). Basal ganglia macrocircuits. *Prog Brain Res*, 160, 3-7.
- Thiriet, N., Aunis, D., Zwiller, J. (2006). The Nitric Oxide Releasing Agent Sodium Nitroprusside Modulates Cocaine-Induced Immediate Early Gene Expression in Rat Brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci*, 965, 47-54.
- Togasaki, D. M., Tan, L., Protell, P., Di Monte, D. A., Quik, M., Langston, J. W. (2001). Levodopa induces dyskinesias in normal squirrel monkeys. *Ann Neurol*, 50, 254-257.
- Togasaki, D. M., Protell, P., Tan, L. C., Langston, J. W., Di Monte, D. A., Quik, M. (2005). Dyskinesias in normal squirrel monkeys induced by nomifensine and levodopa. *Neuropharmacology*, 48, 398-405.
- Tong, J., Fitzmaurice, P. S., Ang, L. C., Furukawa, Y., Guttman, M., Kish, S. J. (2004). Brain dopamine-stimulated adenylyl cyclase activity in Parkinson's disease, multiple system atrophy, and progressive supranuclear palsy. *Ann Neurol*, 55, 125-129.
- Toulouse, A., and Sullivan, A. M. (2008). Progress in Parkinson's disease-where do we stand?. *Prog Neurobiol*, 85, 376-392.

- Tripathi, P. (2007). Nitric oxide and immune response. *Indian J Biochem Biophys*, 44, 310-319.
- Tsai, M. J., and Lee, E. H. (1996). Characterization of L-DOPA transport in cultured rat and mouse astrocytes. *J Neurosci Res*, 43, 490-495.
- Tseng, K. Y., Caballero, A., Dec, A., Cass, D. K., Simak, N., Sunu, E., Park, M. J., Blume, S. R., Sammut, S., Park, D. J., West, A. R. (2011). Inhibition of Striatal Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Reverses Basal Ganglia Dysfunction and Akinesia in Experimental Parkinsonism. *PLoS ONE*, 6.
- Tysnes, O. B., and Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*, 124, 901-905.
- Valastro, B., Andersson, M., Lindgren, H. S., Cenci, M. A. (2007a). Expression pattern of JunD after acute or chronic L-DOPA treatment: comparison with deltaFosB. *Neuroscience*, 144, 198-207.
- Van den Munckhof, P., Luk, K. C., Ste-Marie, L., Montgomery, J., Blanchet, P. J., Sadikot, A. F., Drouin, J. (2003). Pitx3 is required for motor activity and for survival of a subset of midbrain dopaminergic neurons. *Development*, 130, 2535-2542.
- Van Staveren, W. C., Steinbusch, H. W., Markerink-Van Ittersum, M., Repaske, D. R., Goy, M. F., Kotera, J., Omori, K., Beavo, J. A., De Vente, J. (2003). mRNA expression patterns of the cGMP-hydrolyzing phosphodiesterases types 2, 5, and 9 during development of the rat brain. *J Comp Neurol*, 467, 566-580.
- Vincent, S.R., Johansson, O., Hökfelt, T., Skirboll, L., Elde, R.P., Terenius, L., Kimmel, J., Goldstein, M. (1983a). NADPH-diaphorase: a selective histochemical marker for striatal neurons containing both somatostatin- and avian pancreatic polypeptide (APP) like immunoreactivities. *J. Comp. Neurol*, 217, 252-263.
- Vincent, S.R., Staines, W.A., Fibiger, H.C. (1983b). Histochemical demonstration of separate populations of somatostatin and cholinergic neurons in the rat striatum. *Neurosci. Lett.* 35, 111-114.
- Vincent, S. R. (1994). Nitric oxide: a radical neurotransmitter in the central nervous system. *Progress in neurobiology*, 42, 129-160.
- Vincent, S. R. (2010). Nitric oxide neurons and neurotransmission. *Prog. Neurobiol*, 90, 246-255.
- Viola, H., Furman, M., Izquierdo, L. A., Alonso, M., Barros, D. M., de Souza, M. M., Izquierdo, I., Medina, J. H. (2000). Phosphorylated cAMP response element-binding protein as a molecular marker of memory processing in rat hippocampus: effect of novelty. *J Neurosci*, 20, RC112.
- Wang, J. Q., Chu, X. P., Guo, M. L., Jin, D. Z., Xue, B., Berry, T. J., Fibuch, E. E., Mao, L. M. (2012). Modulation of ionotropic glutamate receptors and acid-sensing ion channels by nitric oxide. *Front Physiol*, 3:164.

- Wang, Y., Wang, N., Cai, B., Wang, G. Y., Li, J., Piao, X. X. (2015). In vitro model of the blood-brain barrier established by co-culture of primary cerebral microvascular endothelial and astrocyte cells. *Neural Regen Res*, 10, 2011-2017.
- West, A. R., and Galloway, M. P. (1997a). Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Neuropharmacology*, 36, 1571-1581.
- West, A. R., and Galloway, M. P. (1997b). Inhibition of glutamate reuptake potentiates endogenous nitric oxide-facilitated dopamine efflux in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci. Lett*, 230, 21-24.
- West, A. R., Galloway, M. P., Grace, A. A. (2002). Regulation of striatal dopamine neurotransmission by NO: effector pathways and signaling mechanisms. *Synapse*, 44, 227-245.
- West, A. R., and Grace, A. A. (2004). The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity states and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *Journal of Neuroscience*, 24, 1924-1935.
- West, A. R., and Tseng, K. Y. (2011). Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-Cyclic GMP Signaling in the Striatum: New Targets for the Treatment of Parkinson's Disease? *Front Syst Neurosci*, 30, 5:55.
- West, A. R. (2017) Nitric Oxide Signaling in the Striatum. In H. Steiner & K. Y. Tseng (Eds.), *Handbook of Basal Ganglia Structure and Function* (2nd ed., pp. 3-32), London, Elsevier.
- Westin J. E., Vercammen, L., Strome, E. M., Konradi, C., Cenci, A. M. (2007). Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry*, 62, 800-810.
- Wichmann, T., DeLong, M.R. (2003) Functional neuroanatomy of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Adv. Neurol*, v. 91, p. 9-18.
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., Cenci, M. A. (2002). L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis*, 10, 165-186.
- Xia, Z. G., Refsdal, C. D., Merchant, K. M., Dorsa, D. M., Storm, D. R. (1991). Distribution of mRNA for the calmodulin-sensitive adenylate cyclase in rat brain: expression in areas associated with learning and memory. *Neuron*, 6, 431-443.
- Xilouri, M., Brekk, O. R., Stefanis, L. (2013). Alpha-synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol. Neurobiol*, 47, 537-551.

Yagishita, S., Hayashi-Takagi, A., Ellis-Davies, G. C., Urakubo, H., Ishii, S., Kasai, H. (2014). A critical time window for dopamine actions on the structural plasticity of dendritic spines. *Science*, 345, 1616-1620.

Yamagata, K., Andreasson, K. I., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Worley, P. F. (1993). Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11, 371-386.

Yin, H. H., and Knowlton, B. J. (2006). The role of the basal ganglia in habit formation. *Nat. Rev. Neurosci*, 7, 464-476.

Yuste, J. E., Echeverry, M. B., Ros-Bernal, F., Gomez, A., Ros, C. M., Campuzano, C. M., Fernandez-Villalba, E., Herrero, M. T. (2012). 7-Nitroindazole down-regulates dopamine/DARPP-32 signaling in neostriatal neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 63, 1258-1267.

Zhai, S., Tanimura, A., Graves, S. M., Shen, W., Surmeier, D. J. (2018). Striatal synapses, circuits, and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol*, 48, 9-16.