

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

RAYANNE POLETTI GUIMARAES

**Papel da enzima fosfodiesterase 10A na atividade dos neurônios
espinhosos médios estriatais durante a ocorrência das discinesias
induzidas pela L-DOPA**

Ribeirão Preto

2021

RAYANNE POLETTI GUIMARAES

**Papel da enzima fosfodiesterase 10A na atividade dos neurônios
espinhosos médios estriatais durante a ocorrência das discinesias
induzidas pela L-DOPA**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e
Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre (a) em Ciências

Área de concentração: Psicobiologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Eduardo Padovan
Neto

Ribeirão Preto

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

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.

Rayanne Poletti Guimarães

Papel da enzima fosfodiesterase 10A na atividade dos neurônios médios estriatais durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA

Orientador: Prof. Dr. Fernando Eduardo Padovan-Neto

Ribeirão Preto, 2021

75 p.:il.;

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP

Área de concentração: Psicobiologia

1. L-DOPA 2. Fosfodiesterase 3. Discinesia 4. Parkinson 5. Eletrofisiologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Rayanne Poletti Guimarães

Título: *“Papel da enzima fosfodiesterase 10A na atividade dos neurônios médios estriatais durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA”*

Dissertação apresentada ao Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre (a) em Ciências

Área de concentração: Psicobiologia

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. Fernando E. Padovan-Neto

Instituição: Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP

Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Nome: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

“If the doors of perception were cleansed, everything would appear to man as it is, infinite.”

The Marriage of Heaven and Hell – William Blake

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando E. Padovan-Neto pela orientação impecável, pela paciência, pela dedicação, por todo suporte e apoio dados desde antes mesmo da matrícula, pelos cafés e por todo aprendizado profissional e pessoal, meus eternos agradecimentos por essa oportunidade!

À Profa. Dra. Márcia Mortari, por ser minha inspiração na ciência, pelos ensinamentos, pelo e por sempre ter me encorajado, jamais esquecerei.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) por todo apoio e suporte financeiro para realização deste trabalho através da bolsa de mestrado, processo 2018/12956-5.

Agradeço aos meus pais Raynner e Mariana por serem tão companheiros, por todo exemplo, apoio, amizade, paciência, e por nunca terem deixado faltar o amor, vocês são a minha base. À minha irmã Maryanne, por todo companheirismo, cumplicidade e por todo apoio emocional, saber que tenho você como irmã faz toda a diferença nos meus dias. Aos meus avós Rosi, Nadir, Deusdedit e Dorotéia (em memória), por todo carinho e amor do mundo. À Beatriz, pelos dias de felicidades infinitas, por todo amor, pelo imenso apoio durante a escrita deste trabalho e por resignificar tantas coisas.

A todos os meus amigos de Brasília, em especial meus parceiros de vida: Higor Gabriel, Anna, Fernanda, Lívia e Natuzza, por todo suporte, pelo apoio emocional, pelos momentos mais felizes e por deixarem a vida mais leve, vocês são incríveis. Agradeço também aos meus amigos cientistas: Luís e Tiago, por me inspirarem diariamente e por todo o exemplo.

Aos meus amigos em Ribeirão Preto, em especial: Adriana, Thamyris, Caio, Leonardo, Ananda, por me acompanharem de perto durante este trabalho, pelos momentos incríveis, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amigos do laboratório e do bloco 6, em especial: Ana Luisa, Bruna, Keila, Carlos, Danilo, Mirella e Lívea, por toda ajuda, todos os ensinamentos, desabafos, cafés e lanches, que sorte poder ter conhecido vocês.

Ao Departamento de Psicologia da Universidade de São Paulo – *campus* Ribeirão Preto e a todos os funcionários, pelo suporte e apoio.

Aos animais que doaram suas vidas pela pesquisa, meu imenso agradecimento e todo o meu respeito.

RESUMO

Poletti-Guimarães, R. **Papel da enzima fosfodiesterase 10a na atividade dos neurônios médios estriatais durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-Dopa.** 2021. 75 p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

O tratamento da Doença de Parkinson (DP) com L-DOPA a longo prazo é associado a efeitos colaterais chamados discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs). O estriado é uma estrutura chave dos núcleos da base relacionado com as LIDs. Os neurônios espinhosos médios (MSNs) constituem aproximadamente 95% dos neurônios do estriado e compõe as vias diretas e indiretas do controle motor. O tratamento crônico com L-DOPA é capaz de modular essas vias. Muitas evidências sugerem que as LIDs surgiriam como resultado de um desequilíbrio entre as vias diretas e indiretas. A enzima fosfodiesterase 10A (PDE10A) é expressa principalmente em MSNs no corpo estriado e metaboliza os segundos mensageiros (cAMP e cGMP), exercendo assim uma forte modulação da atividade dos MSNs. Assim, nossa hipótese é de que a inibição da fosfodiesterase 10A teria um efeito antidiscinético ao modular a atividade dos MSNs. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética local (CEUA-FFCLRP / USP (18.5.35.59.5)). Ratos lesionados por 6-OHDA foram tratados cronicamente com L-DOPA (5 mg/kg/dia mais benserazida 12,5 mg/kg/dia, por via subcutânea) uma vez por dia durante uma semana. Após este período, os ratos discinéticos receberam veículo (n = 9) ou inibidor de PDE10A ME3398 (1 mg/kg/dia, n = 6; 3 mg/kg, n = 4; gavagem) uma hora antes de L-DOPA, uma vez ao dia por duas semanas adicionais. As análises comportamentais foram realizadas para quantificar as LIDs que afetam os membros anteriores, axiais e orofaciais de animais parkinsonianos. O teste de caminhada foi realizado uma vez por semana, 1 hora após a administração de levodopa para monitorar o efeito da atividade antiparkinsoniana da L-DOPA nos animais. Após o tratamento, foi realizada eletrofisiologia extracelular *in vivo* no estriado parkinsoniano para caracterizar as atividades evocadas por estimulação cortical e as atividades espontâneas de MSNs. O ME3398 (1 mg/kg) diminuiu as discinesias axiais, do membro anterior e orofaciais 90 minutos após a administração da L-DOPA na terceira semana de tratamento ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA - veículo + L-DOPA). O ME3398 (3 mg/kg) prolongou as discinesias axiais, do membro anterior e orofaciais até 150 minutos após a administração da L-DOPA na terceira semana de tratamento ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA - veículo + L-DOPA). A análise eletrofisiológica revelou que o ME3398 (3 mg/kg) aumentou a probabilidade de disparos dos MSNs evocados pela estimulação do córtex ($p = 0,001$ vs. SHAM – veículo 1 + veículo 2 e $p = 0,001$ vs 6-OHDA – ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA). Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos na atividade espontânea dos MSNs. Esses dados reforçam a discussão de que os inibidores da PDE10A podem aumentar ou diminuir as discinesias, dependendo da dose utilizada. Além disso, os registros eletrofisiológicos sugerem que as discinesias podem aumentar devido à transmissão facilitada da via cortico-estriatal.

Palavras-chave: Discinesia, L-DOPA, Fosfodiesterase 10A, Eletrofisiologia, Parkinson.

ABSTRACT

Poletti-Guimarães, R. **Role of the phosphodiesterase 10A in the activity of medium spiny striatal neurons during the occurrence of L-DOPA induced dyskinesias.** 2021. 75 p. Master's Dissertation - Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo

Long-term treatment of Parkinson's disease (PD) with L-DOPA is associated with side effects called L-DOPA-induced dyskinesias (LIDs). The striatum is a key structure of the striatum related to the LIDs. The medium spiny neurons (MSNs) constitute approximately 95% of the striatal neurons and comprise the direct and indirect motor control pathways. Chronic treatment with L-DOPA is able to modulate these pathways. Much evidence suggests that LIDs would emerge as a result of an imbalance between direct and indirect pathways. The enzyme phosphodiesterase 10A (PDE10A) is expressed mainly in MSNs in the striatum and metabolizes the second messengers (cAMP and cGMP), thus exercising a strong modulation of the activity of MSNs. Thus, our hypothesis is that the inhibition of phosphodiesterase 10A would have an antidyskinetic effect by modulating the activity of MSNs. All procedures were approved by the local ethics committee (CEUA-FFCLRP/USP (18.5.35.59.5)). Rats injured by 6-OHDA were treated chronically with L-DOPA (5 mg/kg/day plus benserazide 12.5 mg/kg/day, subcutaneously) once a day for a week, after this period the dyskinetic rats received vehicle (n = 9) or PDE10A inhibitor ME3398 (1 mg/kg/day, n=6; 3 mg / kg, n=4; gavage) one hour before L-DOPA, once a day for two additional weeks. Behavioral analyzes were performed to quantify limb, axial and orofacial LIDs that affect parkinsonian animals. The walking test was performed once a week, 1 hour after levodopa administration to monitor the effect of L-DOPA antiparkinsonian activity in animals. After treatment, extracellular electrophysiology was performed in vivo in the parkinsonian striatum to characterize the activities evoked by stimulation cortical and spontaneous activities of MSNs. ME3398 (1 mg/kg) decreased axial, forelimb and orofacial dyskinesias 90 minutes after L-DOPA administration in the third week of treatment ($p < 0.05$ vs. 6-OHDA - vehicle + L-DOPA). ME3398 (3 mg/kg) prolonged axial, forelimb and orofacial dyskinesias up to 150 minutes after L-DOPA administration at the third week of treatment ($p < 0.05$ vs. 6-OHDA - vehicle + L-DOPA). Electrophysiological analysis revealed that ME3398 (3 mg/kg) increased the probability of firing of MSNs evoked by cortex stimulation ($p = 0.001$ vs. SHAM - vehicle 1 + vehicle 2 and $p = 0.001$ vs 6-OHDA - ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA). There were no statistically significant differences between groups in the spontaneous activity of MSNs. These data reinforce the discussion that PDE10A inhibitors can increase or decrease dyskinesias, depending on the dose used. Furthermore, electrophysiological recordings suggest that dyskinesias may increase due to facilitated cortico-striatal pathway transmission.

Keywords: Dyskinesia, L-DOPA, Phosphodiesterase 10A, Electrophysiology, Parkinson.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO EXEMPLIFICANDO AS PRINCIPAIS ESTRUTURAS ENVOLVIDAS NO CONTROLE MOTOR NOS NÚCLEOS DA BASE EM HUMANOS. ADAPTADO DE HTTPS://WWW.PHYSIO-PEDIA.COM	14
FIGURA 2: ESQUEMA ILUSTRANDO AS PRINCIPAIS ESTRUTURAS, VIAS E NEUROTRANSMISSORES DO CONTROLE MOTOR NOS NÚCLEOS DA BASE.	19
FIGURA 3: ESQUEMA ILUSTRANDO A SINALIZAÇÃO MOLECULAR NOS NÚCLEOS DA BASE.	25
FIGURA 4: IMAGENS DO PROCEDIMENTO DE CIRURGIA ESTEREOTÁXICA PARA MICROINFUSÃO UNILTATERAL DA 6-OHDA NO FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL.	31
FIGURA 5: EXPERIMENTADOR MANIPULANDO ANIMAL DURANTE A REALIZAÇÃO DO TESTE DE CAMINHADA.	32
FIGURA 6: CRONOGRAMA DOS EXPERIMENTOS DURANTE AS SEMANAS DE TRATAMENTO E ELETROFISIOLOGIA.	34
FIGURA 7: ANIMAIS APRESENTANDO AIMS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DA L-DOPA.	35
FIGURA 8: EXEMPLOS DE COMO FORAM REALIZADOS OS REGISTROS ELETROFISIOLÓGICOS.	37
FIGURA 9: AVALIAÇÃO DO TESTE DE CAMINHADA PRÉ- E PÓS-CIRURGIA PARA INFUSÃO UNILATERAL DE 6-OHDA OU VEÍCULO (SOLUÇÃO SALINA 0,9%) NO FEIXE PROSENCEFÁLICO MEDIAL.	41
FIGURA 10: EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ME3398 (1 MG/KG E 3 MG/KG) E L-DOPA NOS AIMS (A) AXIAIS, (B) MEMBRO ANTERIOR, (C) OROFACIAIS E (D) SOMA TOTAL DOS 3 TIPOS DE AIMS, DURANTE AS SEMANAS DE TRATAMENTO.	43
FIGURA 11: ANÁLISE TEMPORAL DO EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ME3398 NAS DISCINESIAS INDUZIDAS PELA L-DOPA (5 MG/KG) NA SEGUNDA SEMANA DO TRATAMENTO GERAL.	45
FIGURA 12: ANÁLISE TEMPORAL DO EFEITO DO TRATAMENTO CRÔNICO COM ME3398 NAS DISCINESIAS INDUZIDAS PELA L-DOPA (5 MG/KG) NA TERCEIRA SEMANA DO TRATAMENTO GERAL.	47
FIGURA 13: EFEITOS DO TRATAMENTO COM ME3398 (1 E 3 MG/KG) E L-DOPA (5 MG/KG) NO TESTE DE CAMINHADA REALIZADO AO LONGO DO TRATAMENTO CRÔNICO.	49
FIGURA 14: EFEITOS DA LESÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-OHDA NOS DISPAROS EVOCADOS CORTICALMENTE NOS MSNs E SOBRE A LATÊNCIA DE INÍCIO DE DISPARO.	50

FIGURA 15: EFEITOS DA LESÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-OHDA NOS DISPAROS ESPONTÂNEOS NOS MSNs NO ESTRIADO.	51
FIGURA 16: EFEITOS DA COADMINISTRAÇÃO DE L-DOPA E DIFERENTES DOSES DO ME3398 NOS DISPAROS EVOCADOS CORTICALMENTE NOS MSNs E SOBRE A LATÊNCIA DE INÍCIO DE DISPARO.	52
FIGURA 17: EFEITOS DA COADMINISTRAÇÃO DE L-DOPA E DIFERENTES DOSES DO MEE398 NOS DISPAROS ESPONTÂNEOS NOS MSNs NO ESTRIADO.	53

SUMÁRIO

FICHA CATALOGRÁFICA	3
FOLHA DE APROVAÇÃO	4
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO.....	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
SUMÁRIO.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
NÚCLEOS DA BASE E CONTROLE MOTOR	14
DOENÇA DE PARKINSON.....	17
FOSFODIESTERASE 10A	24
2 OBJETIVOS	27
OBJETIVO GERAL.....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
ANIMAIS	30
CIRURGIA PARA INDUÇÃO DE PARKINSON EXPERIMENTAL.....	30
TESTE DE CAMINHADA	31
DESENHO EXPERIMENTAL E FARMACOLOGIA.....	32
MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS ANORMAIS (AIMS).....	34
ELETROFISIOLOGIA	36
PERFUSÃO E HISTOLOGIA	38
ANÁLISE DE DADOS	38
4 RESULTADOS	40
AVALIAÇÃO DA LESÃO DOPAMINÉRGICA.....	41
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 10A ME3398 COM L-DOPA NOS AIMS.....	42
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 10A ME3398 COM L-DOPA NO TESTE DE CAMINHADA	48
EFEITOS DA LESÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-OHDA NA ATIVIDADE EVOCADA PELO CÓRTEX NOS MSNS ESTRIATAIS.....	49

EFEITOS DA LESÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-OHDA NA ATIVIDADE ESPONTANEA NOS MSNS ESTRIATAIS.....	50
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE DOS MSNS EVOCADA PELO CÓRTEX	51
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE ESPONTÂNEA DOS MSNS	52
5 DISCUSSÃO	54
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NO COMPORTAMENTO DISCINÉTICO	56
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE ESPONTÂNEA DOS MSNS	58
EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE DOS MSNS EVOCADA PELA ESTIMULAÇÃO CORTICAL.....	60
LIMITAÇÕES DO TRABALHO.....	63
6 CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

NÚCLEOS DA BASE E CONTROLE MOTOR

Anatomia e fisiologia dos núcleos da base. Os núcleos da base são compostos por um conjunto de regiões neuroanatômicas que tem como uma de suas principais funções modular e controlar os movimentos. As principais regiões dos núcleos da base relacionadas a função motora são: globo pálido externo (GPe) e interno (GPi), núcleo subtalâmico (NST), substância negra compacta (SNc) e reticulada (SNr) e o estriado, composto pelos núcleos caudado e putamen, e estrutura de maior foco deste trabalho (SMITH et al., 2004; STEINER; TSENG, 2017) (Figura 1).

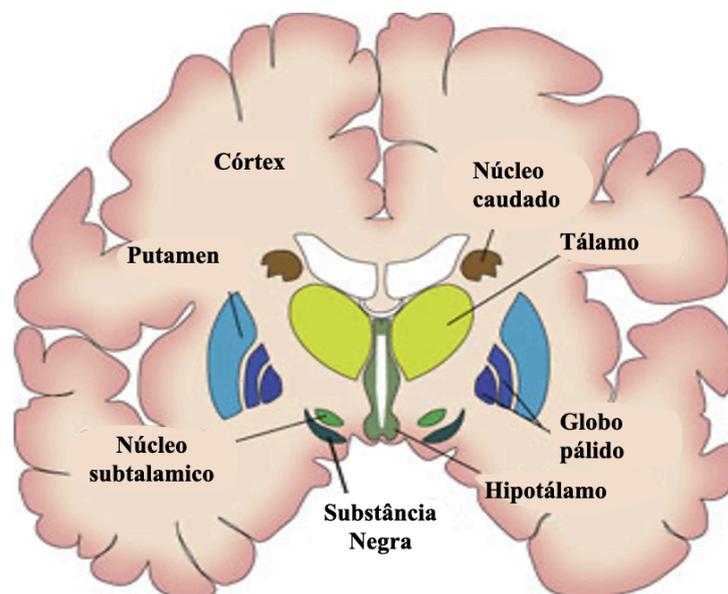


Figura 1: Ilustração exemplificando as principais estruturas envolvidas no controle motor nos núcleos da base em humanos. Adaptado de <https://www.physio-pedia.com>

O estriado (composto pelos núcleos caudado e putamen em humanos) é a maior estrutura que compõe os núcleos da base e a principal região relacionada ao processamento das informações motoras. Cerca de 95% da população neuronal do estriado é composta por neurônios de projeção, chamados de neurônios espinhosos médios (MSNs), que são os principais alvos de entrada e de saída de informações do estriado. Os MSNs são neurônios morfológicamente caracterizados principalmente por grande quantidade de espinhas nos dendritos e projeções colaterais, e utilizam o ácido gama-aminobutírico (GABA) como

neurotransmissor, desempenhando papel inibitório sobre as regiões para onde se projetam (STEINER; TSENG, 2017).

Os MSNs são subdivididos de acordo com seu alvo de projeção, expressão de tipos específicos de receptores dopaminérgicos e co-localização de neuropeptídeos. De acordo com o modelo clássico de funcionamento dos núcleos da base (DELONG, 1990), os neurônios que compõem a via direta (dMSNs), ou via estriato-nigral, se projetam para a substância negra reticulada (SNr) e tem como característica celular a expressão de receptores dopaminérgicos do tipo D1 e dos neuropeptídeos dinorfina e substância P. Os neurônios que compõem a via indireta (iMSNs), ou via estriato-palidal, se projetam para globo pálido externo, e suas características celulares principais são a expressão de receptores dopaminérgicos do tipo D2 e do neuropeptídeo encefalina (DELONG, 1990; GERFEN et al., 1990).

Além disso, a menor parte da população neuronal do estriado é composta por interneurônios. Os interneurônios são classificados de acordo com a expressão de neuropeptídeos e neurotransmissores, e são subdivididos em pelo menos seis principais grupos: (i) grandes interneurônios colinérgicos, identificados através da expressão de acetilcolina transferase (ChAT), (ii) interneurônios GABAérgicos que expressam parvalbumina, (iii) interneurônios GABAérgicos que expressam calretinina, (iv) interneurônios que expressam somatostatina, óxido nítrico sintase (nNOS) e NADPH-diaforase, (v) interneuronios de potencial de ação de baixo limiar (LTS), expressam canais de cálcio com baixo limiar de disparo e (vi) interneurônios GABAérgicos que expressam tirosina hidroxilase (STEINER; TSENG, 2017).

Dopamina. A dopamina é um dos principais neurotransmissores envolvidos no processamento do controle motor nos núcleos da base. Os neurônios dopaminérgicos são caracterizados pela expressão da enzima tirosina-hidroxilase, que participa do processo de conversão da L-DOPA (molécula precursora dopamina) em dopamina no meio intracelular (BJORKLUND; A, 1984; GERFEN; HERKENHAM; THIBAUT, 1987). A SNc e a área tegmental ventral (ATV) dão origem às principais vias dopaminérgicas, a via nigro-estriatal, mesolímbica e a via mesocortical. A via nigro-estriatal tem papel fundamental na modulação dos sinais glutamatérgicos provenientes das aferências do córtex e do tálamo nos MSNs estriatais, e se projeta da SNc para os núcleos caudado e putâmen, disponibilizando a dopamina necessária para auxílio do processamento do controle motor nos núcleos da base (COOPER; BLOOM; ROTH, 2003; STEINER; TSENG, 2017).

A dopamina desempenha funções opostas nas vias direta e indireta do controle motor, uma vez que cada uma das vias expressa receptores dopaminérgicos de tipos diferentes. Os receptores dopaminérgicos do tipo D1 (compostos pelos subtipos D1 e D5) são acoplados a uma proteína G estimulatória (G_s e G_{olf}), então, quando a dopamina se liga ao receptor do tipo D1, ativa a proteína G estimulatória e resulta em atividade excitatória sobre os neurônios. Os receptores dopaminérgicos do tipo D2 (compostos pelos subtipos D2, D3 e D4) são acoplados a uma proteína G inibitória (G_i), então, quando a dopamina se liga ao receptor do tipo D2, ativa a proteína G inibitória e resulta em atividade inibitória sobre os neurônios (STEINER; TSENG, 2017).

Controle motor nos núcleos da base. O modelo clássico do funcionamento e controle motor dos núcleos da base compreende diversos mecanismos neurofisiológicos mais complexos relacionados a circuitaria que envolve o estriado e outras estruturas cerebrais. As principais aferências que chegam ao estriado são projeções glutamatérgicas provenientes do córtex e do tálamo, que exercem atividade excitatória sobre os MSNs. Os MSNs irão se projetar para estruturas cerebrais distintas, caracterizando as vias direta e indireta do controle motor (STEINER; TSENG, 2017) (Figura 2-A).

Na via direta, os MSNs vão se projetar para o complexo formado pelo GPi e SNr, exercendo função inibitória através do neurotransmissor GABA. Esse complexo exercerá atividade inibitória GABAérgica tônica sobre os neurônios pré-motores excitatórios presentes no tálamo, estrutura que se projeta para o córtex, fechando a circuitaria (STEINER; TSENG, 2017) (Figura 2-A).

Na via indireta, os MSNs vão se projetar para GPe, através de projeções GABAérgicas, exercendo função inibitória. O GPe, por sua vez, também irá se projetar ao NST com função inibitória através do neurotransmissor GABA. Por último, o NST irá se projetar para os núcleos de saída GPi/SNr exercendo função excitatória através do neurotransmissor glutamato. Assim, ao excitar o complexo GPi/SNr, os neurônios provenientes do NST são capazes de desinibir a atividade inibitória GABAérgica tônica do complexo GPi/SNr, fazendo com que os núcleos de saída consigam exercer sua atividade inibitória tônica sobre os neurônios pré-motores presentes no tálamo (DELONG; WICHMANN, 2007; GERFEN et al., 1990; STEINER; TSENG, 2017) (Figura 2-A).

Dados os conceitos apresentados, o que propõe o modelo binário clássico de funcionamento dos núcleos da base é que a ação excitatória da dopamina sobre os neurônios

da via direta estimuladora e facilitadora o movimento, enquanto a ação inibitória da dopamina sobre os neurônios da via indireta inibiriam o movimento, compondo então as duas principais vias do controle motor nos núcleos da base. O desequilíbrio entre essas vias e a disfunção do sistema dopaminérgico estão relacionados com diversos distúrbios do controle motor, como a doença de Huntington e a doença de Parkinson (GERFEN et al., 1990). Um outro modelo, propõe ainda a existência de uma via do controle motor denominada hiperdireta, e sugere que o córtex envia projeções diretamente ao NST, o que resultaria em uma neurotransmissão mais rápida do que o que acontece nas vias direta e indireta (NAMBU; TOKUNO; TAKADA, 2002).

DOENÇA DE PARKINSON

Histórico e incidência. Em 1817, ao publicar um ensaio intitulado “Ensaio Sobre a Paralisia Agitante”, James Parkinson descreveu pela primeira vez os sintomas de uma condição patológica que posteriormente viria a ser conhecida como a doença de Parkinson (DP). Alguns dos principais sintomas da DP já se encontravam nessa publicação, porém apenas em 1888 um renomado neurologista do século XIX, Jean-Martin Charcot, acrescentou algumas características-chave da doença, como a bradicinesia (dificuldade de iniciar um movimento) e a rigidez postural, e a nomeou Doença de Parkinson. Apesar das observações feitas a respeito dos principais sintomas e características da doença, ainda não se sabia quais mecanismos patológicos estavam relacionados à causa da doença. Apenas em 1893, Paul Blocq e George Marinesco sugeriram que a substância negra (SN) estaria envolvida e desde então uma série de descobertas vêm contribuindo para elucidação dos mecanismos patológicos da doença (OBESO et al., 2017; PARENT; PARENT, 2010).

No momento, a doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, sendo a primeira a doença de Alzheimer. Cerca de 1% da população mundial acima de 60 anos possui o diagnóstico da doença de Parkinson (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Uma estimativa realizada pelo Global Burden of Disease Study demonstrou que o número de pacientes com DP no mundo vai quase dobrar de 7 milhões (estimativa de 2015) para 13 milhões em 2040, sugerindo que doenças neurodegenerativas como a DP possam se tornar um problema ainda maior para a sociedade (JANKOVIC; TAN, 2020).

Fisiopatologia da DP. A DP tem como características neuropatológicas principais a neurodegeneração progressiva crônica de neurônios dopaminérgicos na SNc e a aglomeração de placas de proteínas contendo α -sinucleína, conhecidas também como corpos de Lewy (GIBB; LEES, 1988). Visto que os neurônios dopaminérgicos da SNc projetam seus axônios para o estriado por meio da via nigro-estriatal, a neurodegeneração de neurônios na SNc acarreta em um déficit dopaminérgico no estriado (STEINER; TSENG, 2017).

A ausência de dopamina no estriado acarreta no desequilíbrio das atividades das vias direta e indireta do controle motor, o que, por sua vez, é responsável pelos principais sintomas motores da DP: a acinesia (dificuldade em iniciar movimentos), bradicinesia (lentidão dos movimentos), rigidez muscular e o tremor de repouso (DEXTER; JENNER, 2013; OBESO et al., 2008; TYSNES; STORSTEIN, 2017)

Mais detalhadamente, a ausência da dopamina no estriado irá acarretar em aumento da atividade dos MSNs da via indireta e, conseqüentemente, na inibição do GPe e desinibição NST. A atividade excitatória do NST, por sua vez, exerce atividade excitatória no complexo GPi/SNr, que possui atividade inibitória GABAérgica tônica, e exercerão forte atividade inibitória sobre os neurônios pré-motores talâmicos (GERFEN et al., 1990) (Figura 2-B). Sendo assim, a ausência de dopamina na DP resulta em maior atividade da via indireta do estriado, causando os principais sintomas motores da doença.

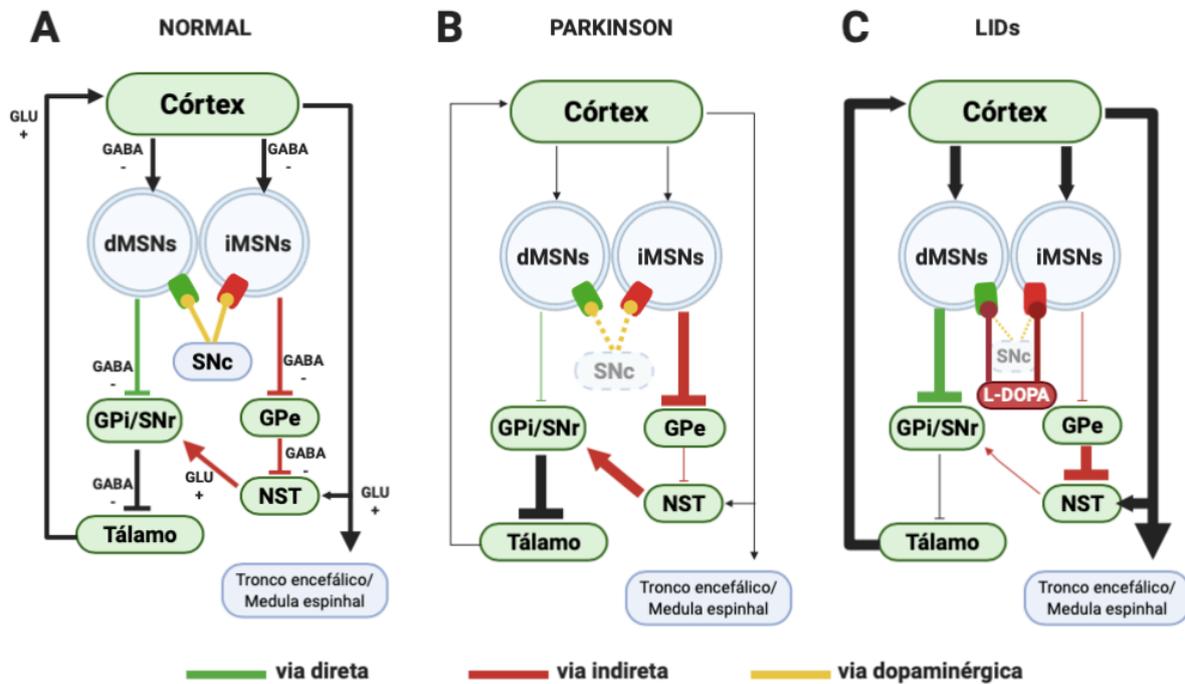


Figura 2: Esquema ilustrando as principais estruturas, vias e neurotransmissores do controle motor nos núcleos da base.

(A) Vias direta e indireta em condições normais; (B) Alteração na atividade das vias direta e indireta na doença de Parkinson; (C) Alteração na atividade das vias direta e indireta nas LIDs. As linhas grossas representam aumento na atividade da via e as linhas finas representam a redução da atividade. Via direta ilustrada em verde, via indireta ilustrada em vermelho e via dopaminérgica ilustrada em amarelo. (dMSN = neurônios espinhos médios estriatais da via direta; iMSN = neurônios espinhos médios estriatais da via indireta; D1 = receptores dopaminérgicos do tipo D1; D2 = receptores dopaminérgicos do tipo D2; SNc = substância negra compacta; GPi = globo pálido interno; SNr = substância negra reticulada; GPe = globo pálido externo; NST = núcleo subtalâmico; GLU = neurotransmissor glutamato; GABA = neurotransmissor GABA). Criado com BioRender.

Além dos sintomas motores, os pacientes apresentam também sintomas não-motores, como por exemplo, comprometimento do olfato, distúrbios gastrointestinais e do sono, distúrbios psicológicos como depressão e ansiedade, fadiga, dentre outros (PFEIFFER, 2016). Esses sintomas muitas vezes podem aparecer antes mesmo dos sintomas motores, visto que os sintomas motores clássicos da DP só começam a se manifestar após perda de 70-80% dos neurônios dopaminérgicos da SNc (OBESO et al., 2017; WIRDEFELDT et al., 2011).

A causa da neurodegeneração dopaminérgica ainda não é conhecida. Estudos apontam que não há apenas um fator, mas vários envolvidos na patogênese na DP, como o estresse oxidativo, a neuroinflamação, excitotoxicidade, acúmulo de proteínas, disfunção mitocondrial, dentre outros (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2013).

Além disso, diversos estudos sugerem a relação com fatores genéticos e também epigenéticos (quando há influências ambientais) nos processos de morte celulares que estão envolvidos na DP. Visto isso, os mecanismos patogênicos envolvidos na DP ainda precisam ser melhor elucidados.

Tratamento da doença de Parkinson. Visto que a ausência de dopamina é a principal causa dos sintomas motores da DP, a reposição não fisiológica da dopamina é, geralmente, a primeira escolha. Porém, essa reposição não é feita através da administração de dopamina porque sua carga molecular não permite sua passagem pela barreira hematoencefálica. Uma estratégia para esse problema, foi utilizar a molécula precursora da dopamina, conhecida como L-DOPA ou Levodopa (OSTER; SORKIN, 1942), que tem sua passagem pela barreira hematoencefálica facilitada através de transportadores de aminoácido, por sua semelhança estrutural. Dentre as farmacoterapias sintomáticas, a L-DOPA demonstrou rápida capacidade de reverter a hipocinesia causada pela DP (HORNYKIEWICZ, 2010).

Após ser transportada para dentro dos neurônios através de transportadores de aminoácidos, a L-DOPA é convertida em dopamina através da enzima dopa-descarboxilase neuronal (JENNER, 2004; MARSDEN; PARKES; QUINN, 1981). Porém, apenas uma pequena fração da L-DOPA chega ao seu alvo, devido a presença da dopa-descarboxilase periférica, enzima que converte a L-DOPA em dopamina, e COMT periférica, enzima que degrada a dopamina. Por isso, a L-DOPA tem sido constantemente associada a outros fármacos capazes de inibir a atividade dessas enzimas, como a Benserazida e a Carbidopa (inibidores da DOPA descarboxilase periférica), a Entacapona (inibidor da COMT), dentro outros, o que gera maior eficiência para o tratamento (DONG et al., 2016).

Apesar da sua eficácia, a L-DOPA também é conhecida por apresentar complicações motoras e efeitos colaterais relacionados ao seu uso prolongado. Uma das complicações motoras mais citada é o aparecimento de movimentos involuntários anormais (AIMs), conhecidos também como discinesias induzidas por L-DOPA (LIDs). Por isso a busca por novos fármacos e novas formas de terapia tem sido constante (STEINER; TSENG, 2017).

A busca por tratamentos mais eficientes para a DP é constante e vêm abrangendo diversas formas de inovação além da farmacoterapia. Atualmente os tratamentos mais comuns são focados em atenuar os sintomas motores da doença, as farmacoterapias mais comumente utilizadas são: A Levodopa, combinada a outros fármacos citados anteriormente; Agonistas dopaminérgicos, os mais comum são ropinirole, pramipexol, rotigotina e apomorfina; Inibidores da catecol-O-metil transferase (COMT), entacapona e nebicaopona são os mais

comuns; Inibidores da enzima monoamina oxidase (MAO), como a selegilina, rasagilina e safinamida; Anticolinérgicos, como o benztropina e triexafenida; Por último, amantadine, medicamento antiviral que é capaz de eliminar os sintomas primários da DP. Outras formas de terapia também estão sendo aplicadas, como a *deep brain stimulation* (DBS) (MALEK, 2019), terapias genéticas (SUDHAKAR; RICHARDSON, 2018) e transplante celular (MORIZANE, 2019). Existem também terapias farmacológicas focadas nos sintomas não-motores, como a depressão e distúrbios gastrointestinais, além de terapias alternativas, como a prática de exercícios físicos, *yoga*, dentre outros (DONG et al., 2016).

LIDs. Após um período de 5 a 10 anos de tratamento com a L-DOPA, cerca de 75-80% dos pacientes relatam complicações motoras caracterizadas por AIMs, também conhecidos por discinesias (CALABRESI et al., 2010). As LIDs são caracterizadas por manifestações motoras casuais, sem finalidade e involuntárias, que quando estabelecidas podem se tornar debilitantes e ainda piores do que os próprios sintomas da DP para a qualidade de vida dos pacientes (DELONG, 1990).

Os fatores principais que parecem contribuir para o desenvolvimento das LIDs estão relacionados a duração da doença, idade do paciente no início da DP e altas dosagens do medicamento durante o tratamento. Estudos sugerem que a longa duração da doença em conjunto com a severidade da lesão dopaminérgica está relacionada com o aparecimento das LIDs (RAJPUT et al., 2002; SHARMA; BACHMANN; LINAZASORO, 2010). A idade do paciente no início da doença também parece ter relação com o alto risco para desenvolvimento das LIDs (KOSTIC et al., 1991; SHARMA; BACHMANN; LINAZASORO, 2010). Além disso, altas dosagens de L-DOPA durante o tratamento estão fortemente relacionadas ao aparecimento das LIDs (WARREN OLANOW et al., 2013).

Apesar dessas evidências, ainda não se sabe exatamente todos os mecanismos fisiológicos e moleculares que estão relacionados à patogênese das LIDs. Dois fatores principais são constantemente discutidos: a estimulação pulsátil dos receptores dopaminérgicos e a degeneração da via nigro-estriatal. Esses dois fatores em conjunto acarretam em uma hipersensibilização na resposta motora que envolve o córtex motor e o estriado (JENNER, 2008).

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos na SNc em conjunto com a reposição farmacológica de L-DOPA faz com que a atividade estriatal fique totalmente instável. Isso acontece porque a morte dos neurônios faz com que a dopamina não seja mais armazenada nas vesículas dos neurônios pré-sinápticos, fazendo com que a cada administração da L-DOPA os

níveis extracelulares de dopamina aumentem (ABERCROMBIE; BONATZ; ZIGMOND, 1990). Sugere-se que a causa do aumento dos níveis extracelulares de dopamina no estriado aconteça porque a ausência de neurônios dopaminérgicos faz com que maior parte da L-DOPA seja convertida a dopamina dentro de neurônios serotoninérgicos. Porém, os neurônios serotoninérgicos não são capazes de regular a liberação de dopamina, diferente do que acontece nos neurônios dopaminérgicos que regulam a disponibilidade de dopamina através de *feedback* negativo mediado por autorreceptores e receptação por transportadores de DA (CARTA et al., 2006).

Visto isso, os altos níveis extracelulares de dopamina vão acarretar em uma excessiva co-estimulação dos receptores D1, acoplados a proteínas G_s , e D2, acoplados a proteínas G_i . Isso resultará em ativação e inibição concomitantemente da cascata de sinalização do AMPc, aumentando os níveis de AMPc na via direta e diminuindo os níveis de AMPc na via indireta (SPIGOLON; FISONE, 2018). Evidências sugerem que os receptores dopaminérgicos do tipo D1 estão mais intimamente relacionados ao aparecimento das LIDs (STEINER; TSENG, 2017). Um estudo demonstrou que a inativação de receptores do tipo D1 através de camundongos *knockout* bloqueou as LIDs, e que a inativação dos receptores do tipo D2 não foi capaz de bloquear as LIDs, pelo contrário, foi capaz de potencializá-las (DARMOPIIL et al., 2009), indicando que os receptores do tipo D2 não são capazes de gerar ou bloquear LIDs, porém são capazes de modular sua incidência.

Além disso, os resultados de estudos que administraram agonistas de receptores do tipo D1 em modelo animal de ratos da DP, demonstraram que os animais também foram capazes de desenvolver LIDs (WESTIN et al., 2007; TAYLOR; BISHOP; WALKER, 2005), enquanto estudos que administraram antagonistas de receptores do tipo D1, demonstraram que o fármaco foi capaz de reduzir as LIDs, apesar do reaparecimento do parkinsonismo (SANTINI et al., 2009; WESTIN et al., 2007).

Por esses fatores, o modelo clássico que descreve a fisiopatologia das LIDs sugere que as LIDs apareceriam como resultado de um desequilíbrio entre as vias diretas e indiretas do controle motor. Diversas evidências sugerem que, ao contrário do que acontece na DP, durante a incidência das LIDs a via direta do controle motor (onde há expressão dos receptores dopaminérgicos do tipo D1) estaria mais ativada, enquanto a via indireta estaria mais suprimida, o que acarretaria em comportamento discinético (CENCI, 2007; FILION; TREMBLAY, 1991) (Figura 2-C).

Um estudo recente demonstrou, utilizando a técnica de optogenética, que durante a incidência das LIDs a taxa de disparos dos dMSNs era maior que o dobro da taxa de disparos

nos dMSNs de ratos saudáveis controle, e além disso, demonstraram também que os iMSNs diminuíram sua taxa de disparos durante a incidência das LIDs. Por último, comprovaram ainda que ao estimular dMSNs de ratos parkinsonianos as LIDs surgiam instantaneamente. Sendo assim, fica claro que a reposição da dopamina com L-DOPA é capaz de modular as duas vias do controle motor e causar as LIDs (RYAN et al., 2018).

Além do estriado e dos MSNs, outra estrutura que está intimamente relacionada a fisiopatologia das LIDs é o córtex e a via cortico-estriatal. Diversos estudos, utilizando a técnica de Imagem de Ressonância Magnética (MRI), em pacientes com PD e LIDs vem demonstrando que a atividade cortical está hiperativada ou desregulada (CERASA et al., 2015; HERZ et al., 2015, 2016), porém a causa dessa hiperatividade na neurotransmissão da via ainda é bastante especulada e os mecanismos moleculares precisam ser melhor elucidados (CENCI et al., 2018). Em especial, o córtex motor primário (M1) é citado em diversos estudos como estrutura envolvida no aparecimento das LIDs (LINDENBACH et al., 2016).

O glutamato regula a atividade dos MSNs no estriado através de receptores NMDA e AMPA. Devido a proximidade de neurônios da via nigro-estriatal e cortico-estriatal, estudos sugerem que os receptores NMDA e dopaminérgicos do tipo D1 são capazes de interagir e formar um complexo NMDA/D1, causando atividade anormal e potencializando as sinapses cortico-estriatais de forma irreversível (CENCI, 2007). Visto isso, após a administração da L-DOPA, devido a atividade anormal da via cortico-estriatal, os MSNs apresentam dificuldade em discriminar informações corticais relevantes, acarretando em prejuízo ao controle motor e incidência das LIDs. Um estudo demonstrou que o desacoplamento do complexo NMDA/D1 foi capaz de atenuar a incidência das LIDs em um modelo animal em ratos (SONG et al., 2018).

O único fármaco com evidências clínicas e aprovado pela FDA pra uso no tratamento das LIDs é a amantadina, um antagonista de receptores NMDA e receptores muscarínicos colinérgicos (PEREZ-LLORET; RASCOL, 2018). Porém, em um estudo realizado em 2017, cerca de 49,3% dos pacientes reportaram efeitos colaterais devido ao uso da amantadina. Entre os efeitos colaterais mais comuns estavam quedas (25,1%), alucinações (19,3%), edema periférico (13,0%), constipação (12,6%), náuseas (8,1%), boca seca (7,2%), insônia (7,2%) e tontura (6,7%). Sendo assim, fica clara a necessidade de aprimorar os mecanismos patológicos relacionados as LIDs para possibilitar a busca por fármacos mais eficientes (PEREZ-LLORET; RASCOL, 2018).

FOSFODIESTERASE 10A

Sinalização molecular nos núcleos da base. No estriado, a dopamina atua sobre os MSNs através de receptores acoplados a proteína G. A proteína G é composta por um complexo contendo as subunidades α , β , e γ . Durante a ação da dopamina nos receptores, o complexo $\alpha\beta\gamma$ se dissocia, dando início a diversas reações bioquímicas e cascatas de sinalização intracelular que regulam a síntese e degradação de nucleotídeos cíclicos (mensageiros secundários) como o AMPc e o GMPc (PADOVAN-NETO; WEST, 2017).

A síntese de AMPc é complexa e necessita da integração de mecanismos extracelulares e intracelulares. No interior das células, a síntese de AMPc é mediada pela enzima adenilato-ciclase (AC) que utiliza como substrato a adenosina trifosfato (ATP). A atividade enzimática da AC também é regulada por outros meios como, por exemplo, influxo de cálcio e proteínas quinases (MONS et al., 1998; SEIFERT et al., 2015). No estriado, a síntese de AMPc é facilitada através da ativação de proteínas G estimulatórias (G_s e G_{olf}) ativadas através da ação da dopamina sobre receptores dopaminérgicos do tipo D1. A inibição da síntese de AMPc é mediada pela dopamina através da ligação em receptores dopaminérgicos do tipo D2 ligados a proteína G inibitória (G_i) (PADOVAN-NETO; WEST, 2017) (Figura 3).

A síntese de GMPc ocorre através da atividade da enzima guanilil ciclase (GC) em suas duas formas: guanilato-ciclase membranaar (pGC), mediada por peptídeos natriuréticos, e guanilato-ciclase solúvel (sGC), mediada pelo neuromodulador óxido nítrico (NO), um radical livre gasoso que não é armazenado nas vesículas pré-sinápticas e é liberado de acordo com a demanda. O NO, por sua vez, é sintetizado pela enzima NO sintase (NOS) que possui quatro isoformas: NOS neuronal (NOS_n), NOS induzível (NOS_i), NOS mitocondrial (NOS_{mt}) e NOS endotelial (NOS_e). A ativação da sGC no estriado através do NO catalisa a conversão do substrato GTP em GMPc. No interior dos neurônios, o GMPc desencadeia varias cascatas de sinalização através da ativação de canais de íons, proteínas quinases G (PKG) e enzimas fosfodiesterases (PADOVAN-NETO; WEST, 2017) (Figura 3).

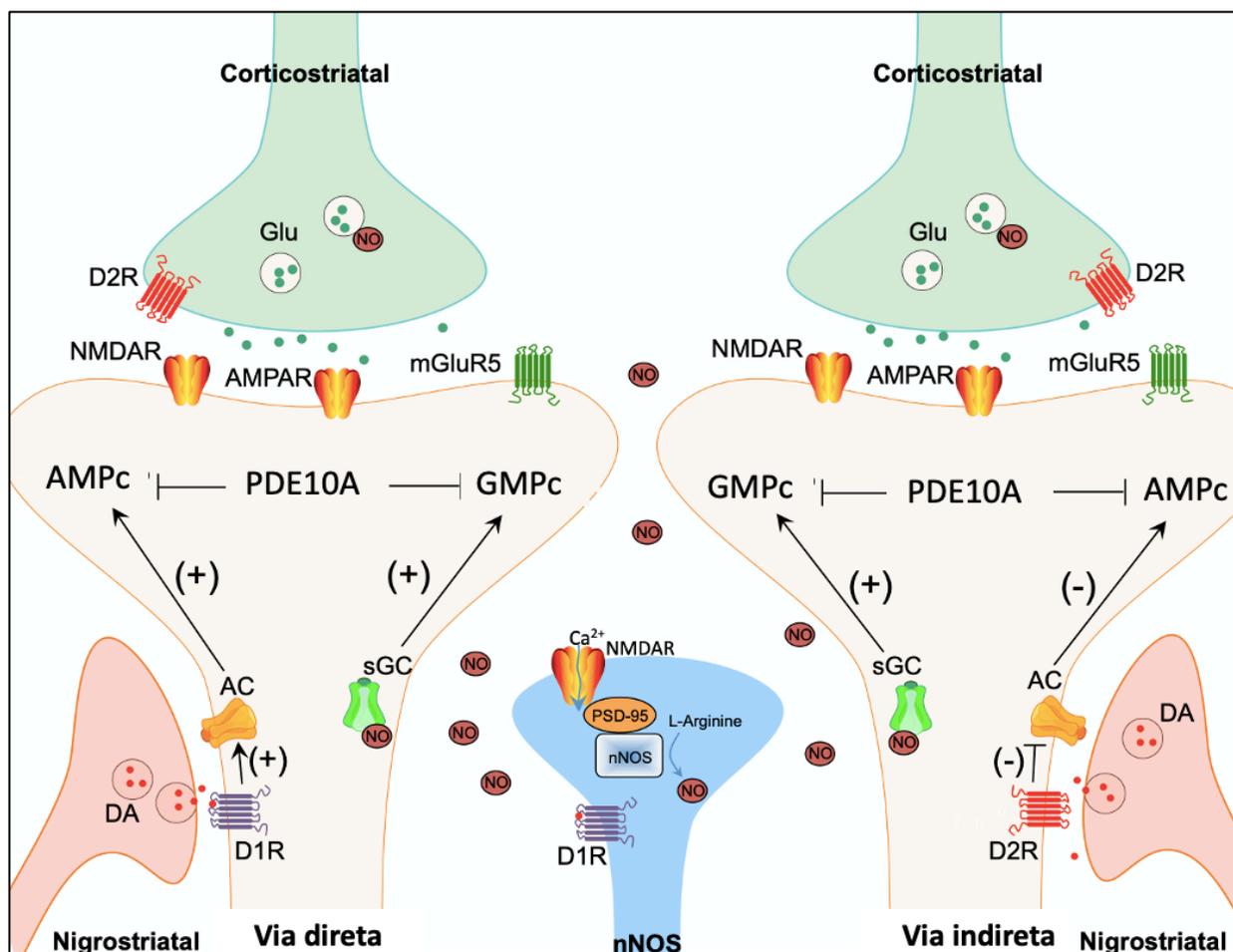


Figura 3: Esquema ilustrando a sinalização molecular nos núcleos da base.

Glu = glutamato; D2R = receptores dopaminérgicos do tipo D2; D1R = receptor dopaminérgico do tipo D1; NMDAR = receptor N-metil-D-aspartato; AMPA = receptor alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico; mGluR5 = receptor metabotrófico de glutamato 5; AMPc = monofosfato cíclico de adenosina; GMPc = monofosfato cíclico de guanosina; PDE10A = fosfodiesterase 10 A; AC = adenilato ciclase; sGC = guanilato ciclase solúvel; DA = dopamina; NO = óxido nítrico; Ca^{2+} = cálcio; nNOS = óxido nítrico sintase neuronal; PSD-95 = proteína.

A fosfodiesterase 10A. As fosfodiesterases (PDEs) são enzimas capazes de modular a atividade sináptica através da regulação da disponibilidade de AMPc e GMPc, e são constituídas por 11 famílias de acordo com sua especificidade para metabolização de substratos (BENDER; BEAVO, 2006). Um estudo quantificou a expressão das famílias de PDEs em diversas estruturas cerebrais através de qPCR e constatou que as PDE10A são as mais expressas no estriado (KELLY et al., 2014). As PDE10A são duplamente específicas, capazes de metabolizar tanto AMPc quanto GMPc (Figura 3). Evidências sugerem que a PDE10A é capaz de regular o acúmulo de nucleotídeos cíclicos próximos as membranas dos neurônios e assim modular a transmissão de informações glutamatérgicas e dopaminérgicas aos MSNs (XIE et al., 2006).

Estudos sugerem que a elevada quantidade de nucleotídeos cíclicos próximos a membrana facilita a excitabilidade de MSNs (THRELFELL; WEST, 2013). Além disso, drogas que são capazes de aumentar a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos (como os inibidores de fosfodiesterases) ou impedir sua degradação (como estimuladores de ciclases) parecem facilitar a neurotransmissão na via cortico-estriatal, enquanto que drogas que diminuem a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos parecem suprimir a neurotransmissão da via (PADOVAN-NETO; WEST, 2017).

Dessa maneira, fica evidente que a PDE10A possui papel importante na regulação da transmissão sináptica dos MSNs e é capaz de modular a atividade da via cortico-estriatal através da regulação da disponibilidade da nucleotídeos cíclicos. Ademais, por sua capacidade de regular a atividade dos MSNs, as PDE10A atuam também regulando o controle motor nos núcleos da base (SEEGER et al., 2003; XIE et al., 2006). Um estudo demonstrou que a deleção da PDE10A induziu hipolocomoção em camundongos, demonstrando íntima relação entre a atividade das PDE10As e o controle motor (SIUCIAK et al., 2006).

Através de sua capacidade de aumentar a disponibilidade de AMPc e GMPc nos MSNs, ativando tanto a via direta como a via indireta do controle motor, as PDE10A exercem a mesma função de agonistas de receptores dopaminérgicos tipo D1 e antagonistas dos receptores do tipo D2 (MEGENS et al., 2014). Essa capacidade de modular as vias do controle motor nos núcleos da base tem tornado as PDE10A um importante alvo para a busca de novos tratamentos de distúrbios motor como a doença de Huntington e doença de Parkinson (PADOVAN-NETO; WEST, 2017).

Diante desses mecanismos farmacológicos únicos, este trabalho busca avaliar o potencial anti-discinético de um novo inibidor da PDE10A, ME3398, e investigar qual a influencia da inibição da PDE10A nos neurônios espinhosos médios estriatais durante a ocorrência das LIDs. Nossa hipótese é de que as LIDs ocorrem devido a alterações na atividade da via cortico-estriatal e também da atividade espontânea dos MSNs no estriado. Esperamos que a inibição da PDE10A seja capaz de diminuir as LIDs através da regulação da atividade da via cortico-estriatal e da atividade dos MSNs estriatais.

2 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL: Investigar qual a influência da inibição da fosfodiesterase 10A nos neurônios espinhosos médios estriatais durante a ocorrência das discinesias induzidas por L-DOPA.

Objetivo específico 1:

Investigar o potencial anti-discinético da inibição da enzima fosfodiesterase 10A nas LIDs.

Objetivo específico 2:

Investigar os efeitos da inibição da enzima fosfodiesterase 10A na modulação da atividade espontânea dos MSNs estriatais.

Objetivo específico 3: Investigar os efeitos da inibição da enzima fosfodiesterase 10A na modulação da atividade dos MSNs estriatais evocada por estimulação cortical.

3 MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Ratos adultos, machos, da espécie Sprague-Dawley (200-250 g) foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de São Paulo – campus Ribeirão Preto e mantidos sob condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C), trocas de ar (15-20 trocas/hora) e ciclos claro-escuro (12C/12E), agrupados em caixas com 3 ou 4 animais, com livre acesso a comida e água. Todos os procedimentos seguiram os princípios éticos do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e foram previamente submetidos e aprovados pelo comitê de ética local (CEUA-FFCLRP/USP (18.5.35.59.5)).

CIRURGIA PARA INDUÇÃO DE PARKINSON EXPERIMENTAL

Para a indução do modelo animal de Parkinson experimental foi realizada cirurgia estereotáxica para microinjeção da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) no feixe prosencefálico medial (JAYASINGHE et al., 2015). Antes do procedimento os animais foram tratados com Pentabiótico veterinário (Zoetis; 1 mg/kg; intramuscular) e Maxicam 2% (1 mg/kg; subcutâneo) e o local de incisão foi submetido a assepsia com iodopovidona. Para eficácia e seletividade da lesão, os animais foram tratados com Imipramina (Alfa Aesar; 10 mg/kg; intraperitoneal), inibidor da recaptação de noradrenalina, 30 minutos antes da infusão da (6-OHDA), evitando que a 6-OHDA fosse captada por terminais noradrenérgicos. Posteriormente, os animais foram anestesiados com Quetamina (Dopalen; 70 mg/kg; intraperitoneal) e Xilazina (Anasedan; 10 mg/kg; intraperitoneal) e fixados em aparelho estereotáxico (Insight Equipamentos®). Após a exposição do crânio do animal, foram tomadas as coordenadas do feixe prosencefálico medial direito para microinjeção unilateral da 6-OHDA (AP: -4,3 mm, ML: +1,6 mm e DV: -8,3 mm, a partir do Bregma; Paxinos & Watson, 2007). Posteriormente, foram microinjetados 4 µL de 6-OHDA em solução salina 0,9% contendo 0,1% de ácido ascórbico, ou apenas o veículo (animais controle), durante 8 minutos, na velocidade de 0,5 µL/min (Figura 4-A). Após a microinjeção, foram aguardados 10 minutos adicionais para evitar um possível refluxo da droga. Em seguida, a incisão foi suturada (Figura 4-B) e o animal foi acomodado em caixa aquecida sob manta térmica para recuperação da anestesia. Após 4 semanas de recuperação, os animais foram submetidos ao teste de caminhada para avaliação da lesão.

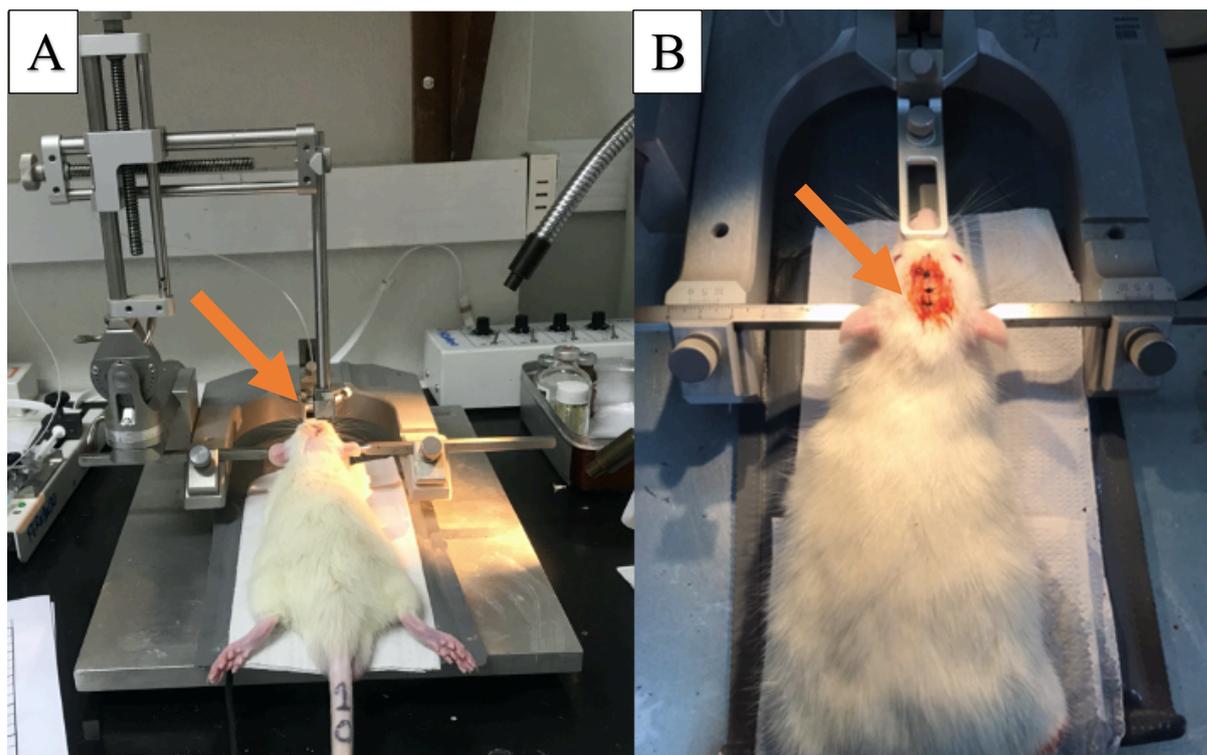


Figura 4: Imagens do procedimento de cirurgia estereotáxica para microinfusão uniltateral da 6-OHDA no feixe prosencefálico medial.

(A) Animal durante o procedimento recebendo a microinfusão de 6-OHDA. (B) Animais com incisão saturada e pronto para recuperação após o procedimento. Fonte: acervo pessoal.

TESTE DE CAMINHADA

Antes do início dos testes de caminhada, os animais foram treinados durante 3 dias para ambientação com o local e familiarização com o experimentador e com o teste. O teste de caminhada foi realizado antes, 2 e 4 semanas após a cirurgia estereotáxica com o objetivo de avaliar a acinesia do membro anterior contralateral e a possível lesão causadas pela 6-OHDA. O teste também foi realizado uma vez por semana, durante as 3 semanas que decorreram o tratamento, 60 minutos após a administração da L-DOPA, para avaliação do efeito antiparkinsoniano da droga. No teste o experimentador segura o rato em um ângulo de 45 graus com a superfície, imobilizando seus membros posteriores e permitindo que apenas um dos membros anteriores de se apoie na plataforma. Com a pata direita apoiada sobre a superfície, o rato é arrastado numa distancia de 90 cm em 5 segundos, na direção *backhand* e *forehand*, e posteriormente, com a pata esquerda apoiada, o animal é arrastado na direção *forehand* e *backhand*, o número de passos dado com cada pata e em cada direção é então quantificado

(OLSSON et al., 1995) (Figura 5). Os animais que apresentaram 5 passos ou menos com a pata contralateral à lesão foram tratados como animais possivelmente lesionados pela 6-OHDA.



Figura 5: Experimentador manipulando animal durante a realização do teste de caminhada.

Experimentador segurando o animal em ângulo de 45 graus com a superfície, imobilizando seus membros posteriores e permitindo que apenas um dos membros anteriores se apoie na plataforma. Na imagem o animal está sendo arrastado com a pata direita na direção *forehand* (pata direita movida da direita para a esquerda).

DESENHO EXPERIMENTAL E FARMACOLOGIA

Após 4 semanas da data de cirurgia iniciamos o tratamento dos grupos amostrais (Tabela 1) uma vez ao dia, de segunda a sexta, conforme descrito na literatura (STEECE-COLLIER et al., 2003). Todos os animais possivelmente lesionados ($n = 9$), foram tratados durante 1 semana com L-DOPA (5 mg/kg combinada com Benserazida 12,5 mg/kg, via gavagem) diluída em salina 0,9% e veículo do ME3398 (solução salina 0,9% contendo metilcelulose a 0,5%), para desenvolvimento de níveis basais de AIMs. Os animais discinéticos foram selecionados para tratamento combinado de inibidor da enzima PDE10A, denominado ME3398 (1 mg/kg, $n = 6$ e 3 mg/kg, $n = 4$, via gavagem), com L-DOPA, por mais 2 semanas, totalizando 3 semanas de tratamento. O ME3398 foi administrado sempre 1 hora antes da administração da L-DOPA. O grupo controle dos animais discinéticos ($n = 9$) continuou recebendo o mesmo tratamento da semana 1 por mais 2 semanas. Os animais do grupo controle ($n = 14$), sham, que durante a cirurgia estereotáxica receberam apenas infusão de salina 0,9% e não foram lesionados, foram tratados durante as 3 semanas de tratamento, apenas com o veículo 1 (salina 0,9%, via

subcutânea) e veículo 2 (solução salina 0,9% contendo metilcelulose a 0,5%, via gavagem). A L-DOPA foi adquirida pela Cayman Chemical Company, enquanto o ME3398 foi fornecido pela empresa Mochida Pharmaceutical Co., LTD.

Durante as 3 semanas do tratamento os experimentos foram realizados da seguinte forma: nas segundas, o tratamento foi realizado sem nenhuma análise posterior. Nas terças realizamos o teste de caminhada 1 hora após a administração da L-DOPA ou veículo 2, para acompanhar o efeito antiparkinsoniano da L-DOPA nos animais. Nas quartas, quintas e sextas, os animais foram gravados durante 3 horas após a administração da L-DOPA ou veículo 2, para posterior análise dos AIMS (Figura 6).

Tabela 1 - Grupos experimentais*

<i>Lesão</i>	Semana 1	Semanas 2 e 3	N/grupo
<i>SHAM</i>	Veículo 1 + Veículo 2	Veículo 1 + Veículo 2	14
<i>6-OHDA</i>	Veículo 1 + L-DOPA	Veículo 1 + L-DOPA	9
<i>6-OHDA</i>	Veículo 1 + L-DOPA	ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA	6
<i>6-OHDA</i>	Veículo 1 + L-DOPA	ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA	4

* Veículo 1 = administração de 5 ml/kg de solução salina 0,9% contendo metilcelulose a 0,5% via gavagem;
 Veículo 2 = administração de 1 ml/kg de solução salina 0,9% via subcutânea;
 O inibidor da PDE10A, ME3398 (1 mg/kg) foi diluído no veículo 1;
 A L-DOPA (5 mg/kg) foi diluída no veículo 2 em conjunto com a benserazida (12,5 mg/kg);
 A administração do veículo 1 ou do inibidor da PDE10A foi realizada 1 hora antes do veículo 2 ou L-DOPA.

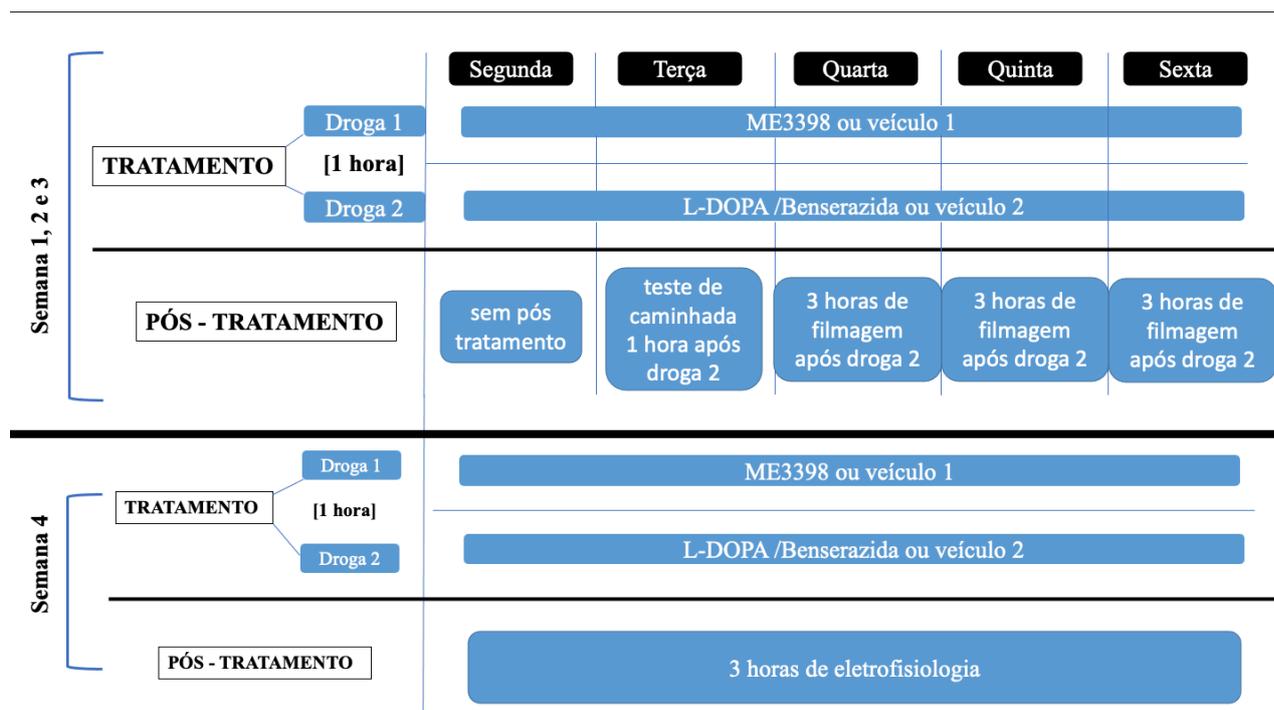


Figura 6: Cronograma dos experimentos durante as semanas de tratamento e eletrofisiologia.

Nas segundas, apenas o tratamento com as duas drogas foi realizado. Nas terças, foi feita a análise do teste de caminhada 1 hora após a administração da droga 2. Nas quartas, quintas e sextas, foram gravadas 3 horas de filmagem 1 hora após administração da droga 2, para análise dos movimentos involuntários anormais (AIMs).

MOVIMENTOS INVOLUNTÁRIOS ANORMAIS (AIMS)

Para analisar as discinesias, aplicamos um método de quantificação de scores para a incidência de AIMs adaptado para ratos (CENCI et al., 1998; LUNDBLAD et al., 2002; WINKLER et al., 2002). Os animais foram filmados por 3 horas após a administração da L-DOPA, conforme Figura 7, em cilindros de acrílico transparente, com estímulos sonoros e visuais em intervalos de 15 em 15 minutos para que fosse possível a aplicação correta dos scores de incidência AIMs. As análises dos AIMs foram feitas durante 1 minuto de vídeo, em intervalos de 30 em 30 minutos após a administração da L-DOPA, até totalizar 180 minutos (3 horas) de tratamento, ou seja, 6 análises com duração de 1 minuto cada em intervalos de 30 em 30 minutos. Três tipos de AIMs foram avaliados: (i) distonia axial: desvio lateral ou torção da cabeça, pescoço e tronco para o lado contralateral à lesão (Figura 7-A); (ii) discinesia do membro anterior: movimentos de flexão-extensão, abdução-adução ou movimento circular do membro anterior contralateral à lesão e inclui a abertura/fechamento dos dígitos e pronação ou supinação do punho (Figura 7-B); (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 (Figura 7-C). A quantificação dos AIMS foi feita através da aplicação de escores referentes ao tempo de incidência dos movimentos utilizando uma escala de 0 a 4, conforme Tabela 2. A amplitude das discinesias axiais e do membro anterior foi avaliada utilizando uma escala de 0 a 4. A amplitude da discinesia orofacial foi realizada utilizando uma escala de 0 a 2, conforme Tabela 3 (WINKLER et al., 2002). Escores intermediários (0,5; 1,5; 2,5; 3,5) também foram utilizados na análise. Os escores temporais e de amplitude foram multiplicados para se obter o escore geral dos AIMS. Foram feitas as médias dos escores gerais de quarta, quinta e sexta para representar cada semana (PADOVAN-NETO et al., 2015).

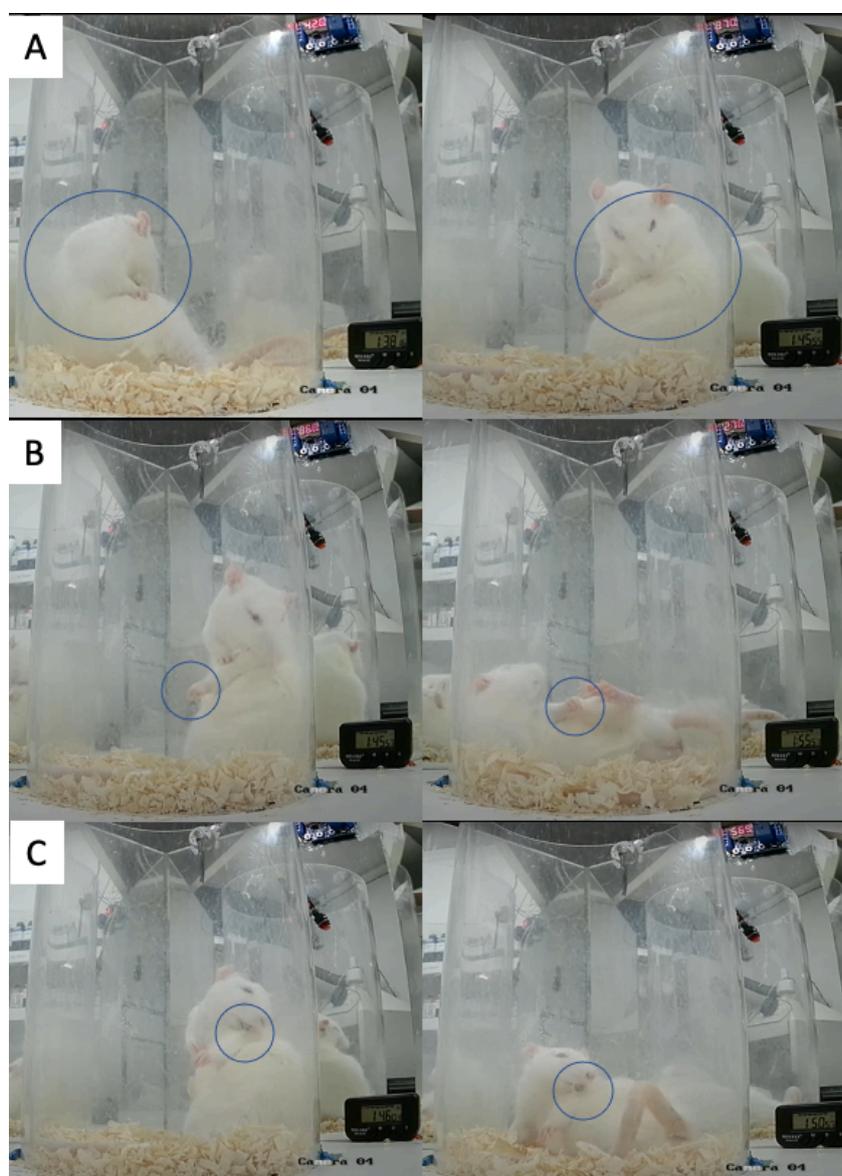


Figura 7: Animais apresentando AIMS após a administração da L-DOPA.

(A) Incidência de discinesia axial; (B) Discinesia do membro anterior; (C) Discinesia orofacial. Fonte: Acervo do Laboratório de Neuropsicofarmacologia dos Distúrbios do Movimento da USP.

Tabela 2 - Escore para avaliação da incidência dos movimentos involuntários anormais (AIMs)

Escore	Incidência do AIM
0	Ausente
1	Ocasional, presentes em menos de 50% do tempo de observação (menos de 30 segundos)
2	Frequente, presentes em mais de 50% do tempo de observação (mais de 30 segundos)
3	Contínuo com interrupção - presente durante todo o tempo de observação com interrupção por estímulo auditivo, visual ou tátil.
4	Contínuo sem interrupção - presente durante todo o tempo de observação sem interrupção por estímulo auditivo, visual ou tátil.

Tabela 3 - Escore para avaliação da amplitude dos movimentos involuntários anormais (AIMs)

Escore	Axial
0	Ausente
1	Torção lateral da cabeça e pescoço em um ângulo de aproximadamente 30°
2	Torção lateral da cabeça e pescoço em uma angulação entre 30° e 60°
3	Torção lateral da cabeça, pescoço e da parte superior do tronco em uma angulação entre 60° e 90°
4	Torção lateral da cabeça, pescoço e da parte superior do tronco em uma angulação superior a 90°
	Membro Anterior
0	Ausente
1	Movimentos brandos que acometem a parte distal do membro anterior
2	Movimentos de baixa amplitude, mas que causam translocação visível na 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. Presença de rotação do membro anterior
	Orofacial
0	Ausente
1	Movimentos orofaciais sem protusão da língua
2	Movimentos orofaciais com protusão da língua

ELETROFISIOLOGIA

Os registros eletrofisiológicos extracelulares unitários foram realizados *in vivo* para que fosse possível preservar as vias neuronais de interesse. Foram realizados registros

extracelulares de atividade espontânea e evocada por estimulação cortical nos MSNs estriatais de 30 a 180 minutos após a administração do veículo 2 ou da L-DOPA (PADOVAN-NETO et al., 2015). Os animais foram anestesiados utilizando uretano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; 1,5 g/kg em solução salina 0,9%, via intraperitoneal) e submetidos a cirurgia estereotáxica, como descrito anteriormente (PADOVAN-NETO et al., 2015; THRELFELL et al., 2009), para a implantação de eletrodos manufacturados a partir de capilares de vidro (2,0 mm de diâmetro, WPI) no estriado para registro dos MSNs (AP: +0,75 mm, ML: 3,5 mm e DV: 2,5 mm) e um eletrodo bipolar de estímulo no córtex motor primário (AP: +3,0 mm, ML: 2,5 mm e DV: 2,0 mm) ipsilateral ao estriado parkinsoniano (Figura 8-A) (PADOVAN-NETO et al., 2015).

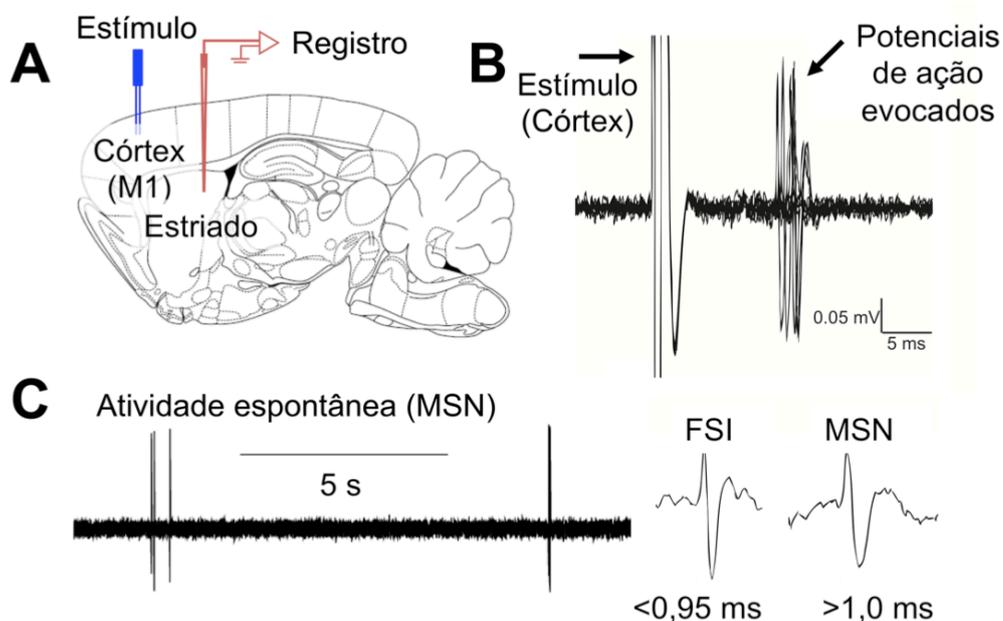


Figura 8: Exemplos de como foram realizados os registros eletrofisiológicos.

(A) Ilustração mostrando a implantação de um eletrodo de estímulo (azul) no córtex motor (M1) e uma pipeta de registro (vermelho) no estriado; (B) Exemplo de potenciais de ação registrados em um MSN evocados por estimulação cortical. Note que a resposta é monossináptica com uma latência de aproximadamente 5-15 ms; (C) Exemplo da atividade espontânea (sem estimulação cortical) do mesmo MSN demonstrado em “B”. É possível diferenciar MSNs de outros interneurônios estriatais através da medida da duração do potencial de ação. O exemplo mostra a duração do potencial de ação de um interneurônio estriatal que expressa parvalbumina (*fast spiking interneuron*, FSI) e de um MSN.

Os capilares de vidro utilizados para o registro foram preenchidos com solução de NaCl 2M e foram introduzidos no estriado de forma lenta com micromanipulador (MO-8, Narashige). Foram aplicados estímulos de baixa frequência (0,5 Hz, 0,5 ms) no córtex motor

para imitar a ocorrência natural da atividade glutamatérgica nos animais anestesiados (Sammut et al., 2010; Sharott et al., 2012; S. Threlfell et al., 2009). Uma vez que os pulsos de baixa frequência utilizados nesse estudo estimulam a atividade glutamatérgica que converge para os MSNs estriatais, esse protocolo de estimulação cortical simula a atividade glutamatérgica cortical que ocorre naturalmente nos núcleos da base e que é responsável por gerar potenciais de ação nos MSNs (West & Grace, 2004). Quando um neurônio respondia aos estímulos corticais com uma latência curta (monosináptica, 5-15 ms) (Figura 8-B), a probabilidade de disparos evocados por estimulação do córtex motor foi avaliada durante 50 estímulos corticais, em estímulos de 3 diferentes intensidades (600, 800, e 1000 μ A). Em seguida, a atividade espontânea (sem estimulação cortical) foi registrada por um período de 3 minutos (Figura 11-C). A atividade de cada neurônio isolado foi amplificada (IR-183, Cygnus Technology Inc.), filtrada (8 kHz para low-pass e 400 Hz high-pass), digitalizada (20 kHz) e gravada em um computador integrado com um sistema de aquisição de dados (Digidata 1550B4, Molecular Devices). Neurônios estriatais exibindo potenciais de ação característicos de neurônios colinérgicos ou nitrérgicos (taxas de disparo de 1 a 4 Hz) ou parvalbuminérgicos (*fast spiking interneurons*, FSIs; que respondem à estimulação cortical de baixa intensidade com sequências curtas de potenciais de ação) não foram agrupado com os MSNs (Figura 8-C).

PERFUSÃO E HISTOLOGIA

Após a eletrofisiologia, realizamos a perfusão transcardíaca por meio da artéria aorta (Notter et al., 2014) com 150 ml de solução cefalorraquidiana artificial durante 15 minutos e removemos o encéfalo dos animais. Os encéfalos foram pós-fixados em tampão fosfato (PB) 0,1M contendo paraformaldeído 4% (PFA) por 90 minutos, depois lavados com solução PB 0,1M e transferidos para crioproteção em solução PB 0,1M contendo sacarose 30% até seu congelamento com isopentano a -40/-50°C e armazenados em freezer -80°C até a histologia.

Na histologia, os encéfalos congelados foram seccionados (50 μ m) e utilizados para realização de imunocitoquímica para confirmação da lesão de 6-OHDA, através da marcação de tirosina hidroxilase (TH) da via nigro-estriatal (PADOVAN-NETO et al., 2015).

ANÁLISE DE DADOS

O teste de caminhada, os escores aplicados para os AIMs e os dados eletrofisiológicos foram avaliados de acordo com critérios já estabelecidos anteriormente (PADOVAN-NETO et

al., 2015). A significância estatística dos efeitos induzidos por fármacos no teste de caminhada e nos AIMS foi determinado utilizando-se, respectivamente, ANOVA de uma e de duas vias de medidas repetidas. A significância estatística dos efeitos induzidos por fármacos na atividade neuronal foi determinada utilizando-se ANOVA de duas vias. O teste *post-hoc* de Holm Sidak foi usado para determinar que grupo(s) contribuiu para os efeitos gerais ou com as interações observados com a ANOVA. Em todas as comparações realizadas, a probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada para determinar diferenças significantes. Todos os dados estatísticos foram analisados através do programa GraphPad Prism (Version 7.0a – GraphPad Software, Inc.).

4 RESULTADOS

AVALIAÇÃO DA LESÃO DOPAMINÉRGICA

Primeiramente realizamos o teste de caminhada que nos possibilitou avaliar a acinesia do membro anterior contralateral à lesão e selecionar os animais com possível lesão da via nigro-estriatal induzida pela infusão de 6-OHDA (Figura 9). A comparação realizada antes, 2 semanas e 4 semanas após a cirurgia para indução do Parkinson experimental revelou interação ($F_{2,74} = 93,63$; $p < 0,0001$; ANOVA de duas vias de medidas repetidas) entre os fatores tempo (pré, 2 e 4 semanas após a cirurgia) e tratamento (sham e 6-OHDA). O teste de Bonferroni mostrou uma diminuição significativa no número de passos contralaterais à lesão dos animais que receberam 6-OHDA no feixe prosencefálico medial direito, quando comparados aos animais sham na segunda e na quarta semana após a cirurgia ($p < 0,0001$) (Figura 9). Os resultados foram consistentes com estudos anteriores (Olsson et al. 1995). A confirmação da lesão está sendo realizada através da análise da imunohistoquímica para enzima TH.

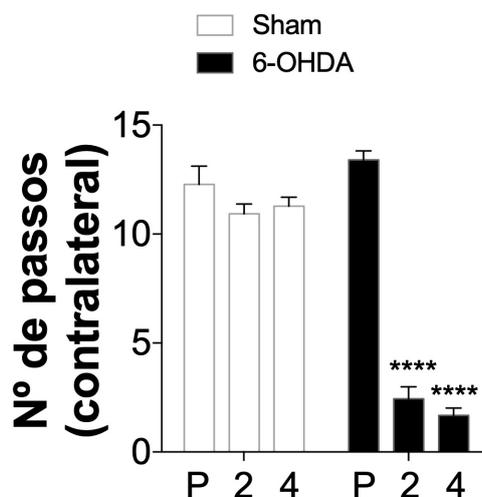


Figura 9: Avaliação do teste de caminhada pré- e pós-cirurgia para infusão unilateral de 6-OHDA ou veículo (solução salina 0,9%) no feixe prosencefálico medial.

Os dados demonstram que os animais que receberam 6-OHDA tiveram uma diminuição significativa do número de passos com o membro anterior contralateral a lesão na segunda e na quarta semana após a cirurgia (**** $p < 0,0001$ vs. sham pós-cirurgia; ANOVA de duas vias de medidas repetidas, *post-hoc* de Bonferroni). Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 14 animias no grupo sham e 25 animais no grupo 6-OHDA.

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 10A ME3398 COM L-DOPA NOS AIMS

Do total de 25 animais que possuíam lesão causada por 6-OHDA, apenas 19 desenvolveram discinesia e puderam ser distribuídos nos grupos para tratamento, resultando em uma porcentagem de 76% de animais possivelmente lesionados

Investigamos o efeito do tratamento semanal em cada tipo de AIM e comparamos o resultado individual de cada semana. A análise estatística da discinesia axial mostrou que houve efeito para o fator tempo ($F_{2,32} = 12,41$; $p < 0,0001$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,813$; $p > 0,05$) e não houve interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{4,32} = 1,374$; $p > 0,05$; Figura 10-A). A análise estatística das discinesias do membro anterior também revelou que houve efeito para o fator tempo ($F_{2,32} = 11,15$; $p = 0,0002$), não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,702$; $p > 0,05$) e não houve interação entre o fator tratamento e tempo ($F_{4,32} = 1,198$; $p > 0,05$; Figura 10-B). Houve efeito para o fator tempo ($F_{2,32} = 10,05$; $p = 0,0004$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,887$; $p > 0,05$) e não houve interação entre os fatores tratamento e tempo na análise das discinesias orofaciais ($F_{4,32} = 0,7741$; $p > 0,05$; Figura 10-C). Realizamos uma soma total dos 3 tipos de discinesias e os resultados revelaram que houve efeito para o fator tempo ($F_{2,32} = 11,73$; $p = 0,0002$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,911$; $p > 0,05$) e também não houve interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{4,32} = 1,11$; $p > 0,05$; Figura 10-D).

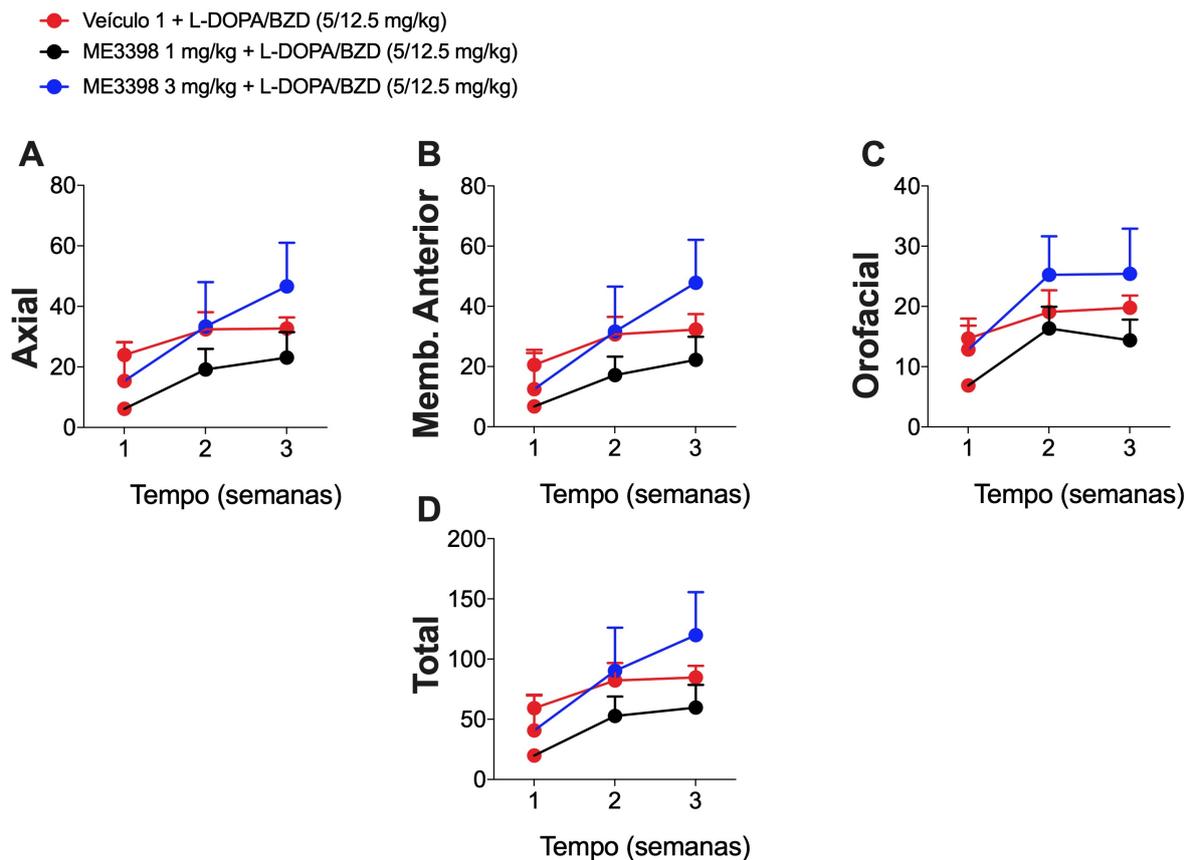


Figura 10: Efeito do tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg e 3 mg/kg) e L-DOPA nos AIMs (A) axiais, (B) membro anterior, (C) orofaciais e (D) soma total dos 3 tipos de AIMs, durante as semanas de tratamento.

Nenhuma das análises revelou interação entre os fatores tratamento e tempo. **A, B, C e D:** ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de *post hoc* de Holm Sidak. Resultados são baseados em 9 animias no grupo 6-OHDA - veículo 1 + L-DOPA, 6 animais no grupo 6-OHDA - ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA e 4 animais 6-OHDA - ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA.

Avaliamos o efeito temporal do tratamento crônico com ME3398 e L-DOPA na segunda semana do tratamento geral. (Figura 11).

Os resultados demonstraram que nas discinesias axiais houve efeito para fator tempo ($F_{5,80} = 16,8$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{10,80} = 2,864$; $p < 0,01$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,911$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que o tratamento ME3398 (1 mg/kg) diminuiu as discinesias 60 minutos ($p < 0,05$) e 90 minutos ($p < 0,05$) após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA (Figura 11-A).

As análises das discinesias do membro anterior demonstraram que houve efeito para fator tempo ($F_{5,80} = 15,47$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{10,80} = 2,573$; $p < 0,01$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,009$; $p > 0,05$). O teste

post hoc de Holm Sidak revelou que o tratamento ME3398 (1 mg/kg) diminuiu as discinesias 90 minutos ($p < 0,05$) após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA (Figura 11-B).

Quanto as discinesias orofaciais, os resultados demonstraram que houve efeito para o fator tempo ($F_{5,80} = 25,02$; $p < 0,0001$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 0,8548$; $p > 0,05$) e nem interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{10,80} = 1,396$; $p > 0,05$) (Figura 11-C).

A soma total dos três tipos de discinesias na semana 2, revelou que houve efeito para fator tempo ($F_{5,80} = 19,98$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{10,80} = 2,453$; $p < 0,05$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 0,9132$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que o tratamento ME3398 (1 mg/kg) diminuiu as discinesias 90 minutos ($p < 0,05$) após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA (Figura 11-D).

De maneira geral e com exceção das discinesias orofaciais, o tratamento com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu as discinesias no pico de efeito da L-DOPA, 90 minutos após sua administração. O ME3398 (3 mg/kg) não interferiu com a incidência das discinesias na semana 2 de tratamento.

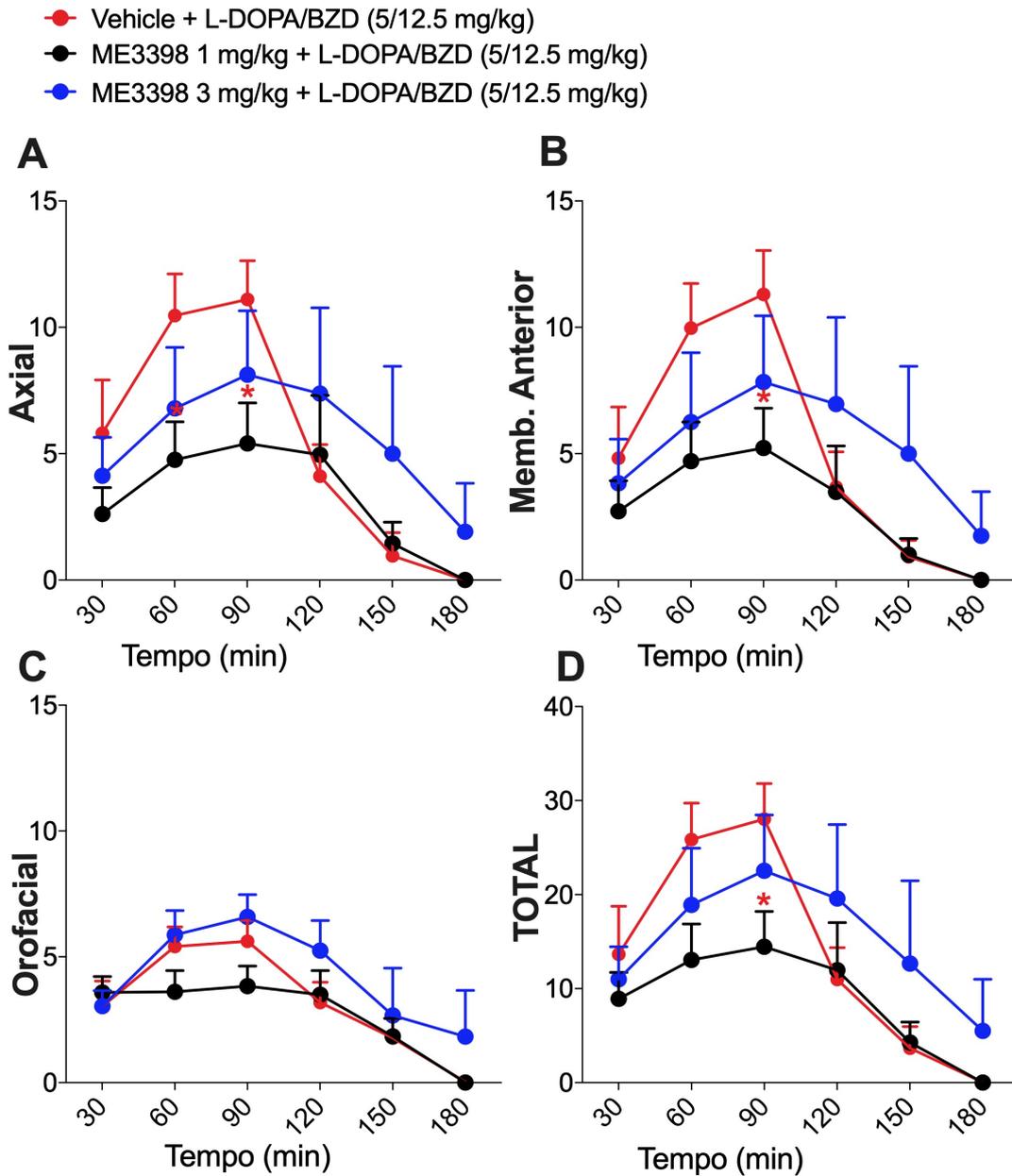


Figura 11: Análise temporal do efeito do tratamento crônico com ME3398 nas discinesias induzidas pela L-DOPA (5 mg/kg) na segunda semana do tratamento geral.

(A) A análise demonstrou que o tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias axiais 60 minutos (* $p < 0,05$) e 90 minutos (* $p < 0,05$) após a administração da L-DOPA (vs veículo 1 +L-DOPA); (B) O tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias do membro anterior 90 minutos após a administração da L-DOPA (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA); (C) Não houve diferença significativa estatisticamente nas discinesias orofaciais; (D) O tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias totais (soma dos três tipos) 90 minutos após a administração da L-DOPA (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA). A, B, C e D: ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de *post hoc* de Holm Sidak. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 9 animais no grupo 6-OHDA - veículo 1 + L-DOPA, 6 animais no grupo 6-OHDA - ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA e 4 animais 6-OHDA - ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA.

Com a finalidade de explorar o efeito temporal do tratamento crônico com ME3398 e L-DOPA na terceira semana do tratamento geral, quantificamos cada tipo de AIM durante três dias da semana, somamos os scores, obtivemos uma média semanal e realizamos uma análise temporal do tratamento (Figura 12).

A análise das discinesias axiais demonstrou que houve efeito no fator tempo ($F_{5,80} = 34,9$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tratamento e tempo na terceira semana do tratamento ($F_{10,80} = 4,803$; $p < 0,0001$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,908$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que a dose de 1 mg/kg de ME3398 diminuiu as discinesias axiais 90 minutos após a administração da L-DOPA ($p < 0,03$) em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA e que o tratamento com ME3398 na dose de 3 mg/kg aumentou as discinesias axiais 150 minutos após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo veículo + L-DOPA ($p < 0,002$) e em comparação grupo tratado com 1 mg/kg do ME3398 ($p < 0,05$; Figura 12-A)

A análise das discinesias do membro anterior mostrou que houve efeito no fator tempo ($F_{5,80} = 25,96$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tratamento e tempo na terceira semana do tratamento ($F_{10,80} = 3,701$; $p < 0,0005$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 2,052$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que a dose de 1 mg/kg de ME3398 diminuiu as discinesias axiais 90 minutos após a administração da L-DOPA ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA e que o tratamento com ME3398 na dose de 3 mg/kg aumentou as discinesias axiais 120 minutos após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo tratamento com 1 mg/kg ($p < 0,05$) e 150 minutos em comparação ao grupo veículo + L-DOPA ($p < 0,01$) e em comparação grupo tratado com 1 mg/kg do ME3398 ($p < 0,05$; Figura 12-B)

A análise das discinesias orofaciais, mostrou que houve efeito no fator tempo ($F_{5,80} = 30,45$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tratamento e tempo na terceira semana do tratamento ($F_{10,80} = 3,482$; $p < 0,001$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 1,795$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que a dose de 1 mg/kg de ME3398 diminuiu as discinesias axiais 90 minutos após a administração da L-DOPA ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA e que o tratamento com ME3398 na dose de 3 mg/kg aumentou as discinesias axiais 150 minutos após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo veículo + L-DOPA ($p < 0,05$) (Figura 12-C)

A soma total dos três tipos de discinesias na semana 3, revelou que houve efeito para fator tempo ($F_{5,80} = 35,12$; $p < 0,0001$) e interação entre os fatores tempo e tratamento ($F_{10,80} = 4,462$; $p < 0,0001$), porém não houve efeito para o fator tratamento ($F_{2,16} = 2,113$; $p > 0,05$). O

teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que a dose de 1 mg/kg de ME3398 diminuiu as discinesias axiais 90 minutos após a administração da L-DOPA ($p < 0,05$) em comparação ao grupo tratado apenas com veículo + L-DOPA e que o tratamento com ME3398 na dose de 3 mg/kg aumentou as discinesias axiais 120 minutos após a administração da L-DOPA em comparação ao grupo tratado com 1 mg/kg ($p < 0,05$), e 150 minutos em comparação ao grupo veículo + L-DOPA ($p < 0,01$) e em comparação ao grupo tratado com 1 mg/kg do ME3398 ($p < 0,05$; Figura 12-D)

De maneira geral, o tratamento com ME3398 (1 mg/kg) foi capaz de reduzir todas as discinesias no pico da L-DOPA, após 90 minutos da sua administração. Nos tempos 120 e 150 minutos observamos que o grupo tratado com ME3398 (3 mg/kg) teve sua discinesia prolongada quando comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com ME3398 (1 mg/kg).

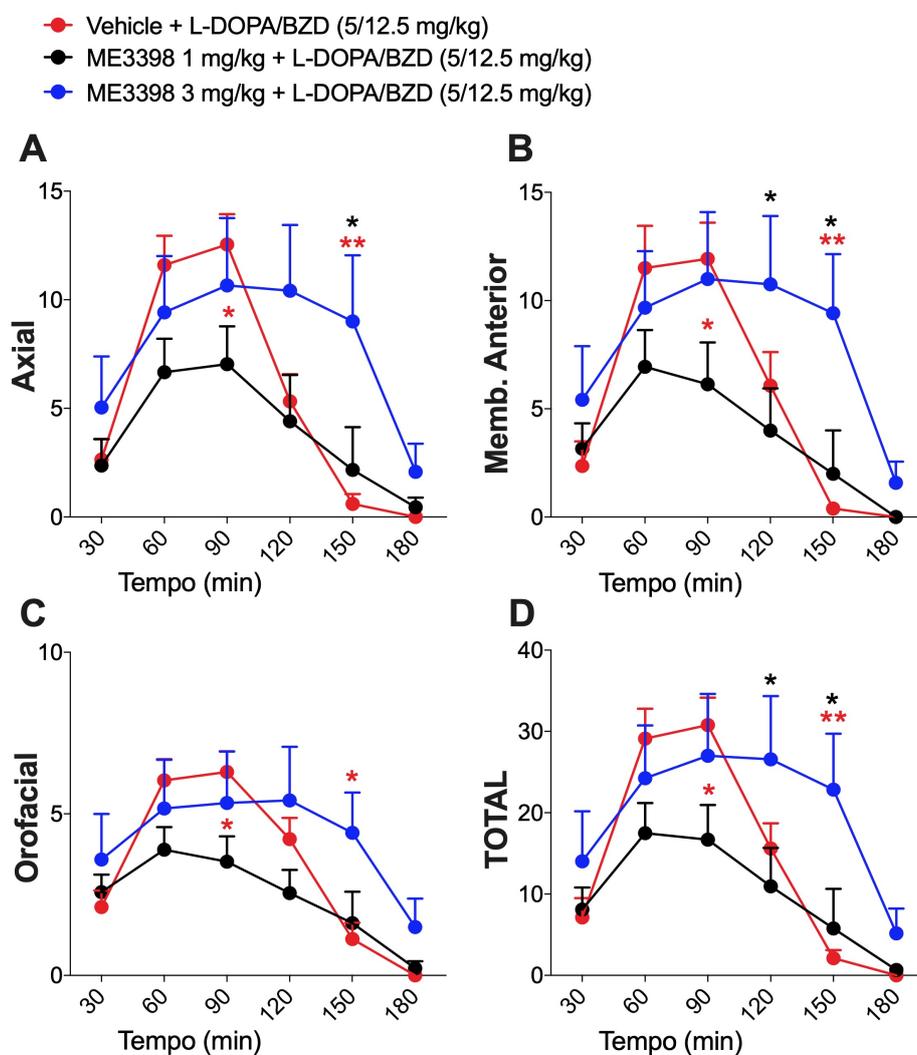


Figura 12: Análise temporal do efeito do tratamento crônico com ME3398 nas discinesias induzidas pela L-DOPA (5 mg/kg) na terceira semana do tratamento geral.

(A) A análise demonstrou que o tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias axiais 90 minutos após a administração da L-DOPA ($*p < 0,05$) e o tratamento com ME3398 (3 mg/kg) aumentou

as discinesias 150 minutos após a administração da L-DOPA (** $p < 0,01$ vs veículo 1 +L-DOPA; * $p < 0,05$ vs ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA); **(B)** O tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias do membro anterior 90 minutos após a administração da L-DOPA (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA) e o tratamento com ME3398 (3 mg/kg) aumentou as discinesias 120 minutos (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA) e 150 minutos após a administração da L-DOPA (** $p < 0,01$ vs veículo 1 +L-DOPA; * $p < 0,05$ vs ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA) **(C)** Nas discinesias orofaciais, o tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias axiais 90 minutos após a administração da L-DOPA (* $p < 0,05$) e o tratamento com ME3398 (3 mg/kg) aumentou as discinesias 150 minutos após a administração da L-DOPA (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA); **(D)** O tratamento crônico com ME3398 (1 mg/kg) diminuiu a incidência das discinesias totais (soma dos três tipos) 90 minutos após a administração da L-DOPA (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA) e o tratamento com ME3398 (3 mg/kg) aumentou as discinesias 120 minutos (* $p < 0,05$ vs veículo 1 +L-DOPA) e 150 minutos após a administração da L-DOPA (** $p < 0,01$ vs veículo 1 +L-DOPA; * $p < 0,05$ vs ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA). **A, B, C e D:** ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida de *post hoc* de Holm Sidak. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 9 animias no grupo 6-OHDA - veículo 1 + L-DOPA, 6 animais no grupo 6-OHDA - ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA e 4 animais 6-OHDA – ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA.

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DO INIBIDOR DA FOSFODIESTERASE 10A ME3398 COM L-DOPA NO TESTE DE CAMINHADA

O teste de caminhada com o membro anterior contralateral foi realizado uma vez por semana, durante o tratamento crônico, para avaliar se o composto ME3398 (1 e 3 mg/kg) interfere na atividade antiparkinsoniana da L-DOPA (5 mg/kg). Os resultados revelaram que o grupo tratado com veículo + L-DOPA apresentou aumento significativo no número de passos durante a primeira ($p < 0,05$), segunda ($p < 0,05$) e terceira semana de tratamento ($p = 0,0567$) (Figura 13-A). As análises não demonstraram diferenças significativas no teste realizado com o grupo tratado com ME3398 1 mg/kg + L-DOPA nem com o grupo tratado com ME3398 3 mg/kg + L-DOPA (Figura 13-B e C) apesar do grupo ME3398 (1 mg/kg) ter demonstrado uma tendência ao aumento na quantidade de passos da terceira semana de tratamento.

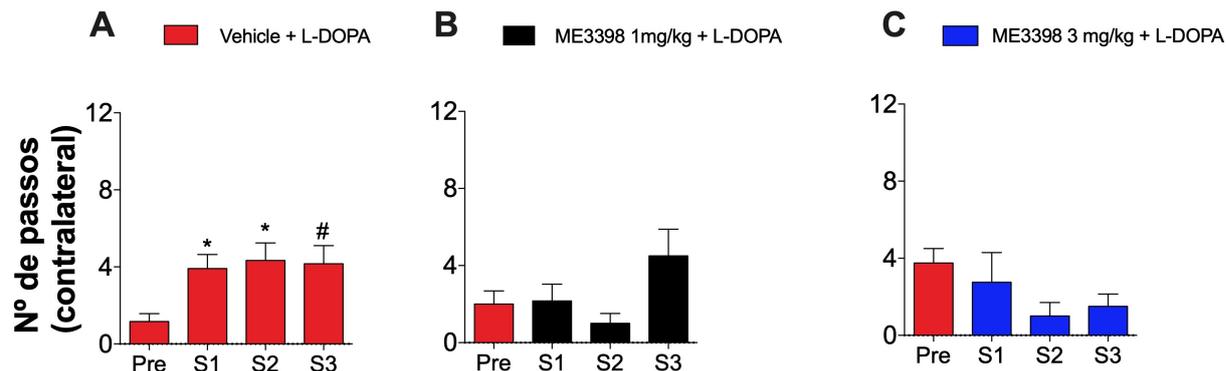


Figura 13: Efeitos do tratamento com ME3398 (1 e 3 mg/kg) e L-DOPA (5 mg/kg) no teste de caminhada realizado ao longo do tratamento crônico.

(A) O grupo 6-OHDA veículo 1 + L-DOPA demonstrou aumento significativo no número de passos durante a primeira ($p < 0,02$), segunda ($p < 0,02$) e terceira semana de tratamento ($p = 0,0567$); (B) O grupo ME3398 (1 mg/kg) não diferiu significativamente no número de passos apresentados pelos animais antes ou durante o tratamento ($p > 0,05$); (C) O grupo ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA (5 mg/kg) não diferiu do número de passos apresentados pelos animais antes ou durante o tratamento ($p > 0,05$). A, B e C: ANOVA de uma via de medidas repetidas e o *post-hoc* de Holm Sidak. Dados expressos como média \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 9 animais no grupo 6-OHDA - veículo 1 + L-DOPA, 6 animais no grupo 6-OHDA - ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA e 4 animais 6-OHDA - ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA.

EFEITOS DA LESÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-OHDA NA ATIVIDADE EVOCADA PELO CÓRTEX NOS MSNS ESTRIATAIS

Primeiro, investigamos como o efeito da lesão dopaminérgica induzida pela neurotoxina 6-OHDA poderia interferir na atividade espontânea e evocada pelo córtex dos MSNs estriatais ipsilaterais à lesão. A comparação entre os animais sham e os animais lesionados, demonstrou efeito para o fator intensidade de corrente ($F_{2,78} = 10,14$; $p = 0,0001$), porém não demonstrou efeito para o fator tratamento ($F_{1,78} = 3,241$; $p = 0,0757$) e nem interação entre os fatores tratamento e tempo ($F_{2,78} = 1,104$; $p > 0,05$) (Figura 14-A). A análise da latência de início dos disparos dos MSNs estriatais evocados corticalmente revelou uma diminuição significativa da latência nos animais lesionados ($F_{15,11} = 1,601$; $p < 0,003$; Figura 14-B). Em conjunto, essas análises sugerem uma facilitação da transmissão da via cortico-estriatal nos animais lesionados por 6-OHDA.

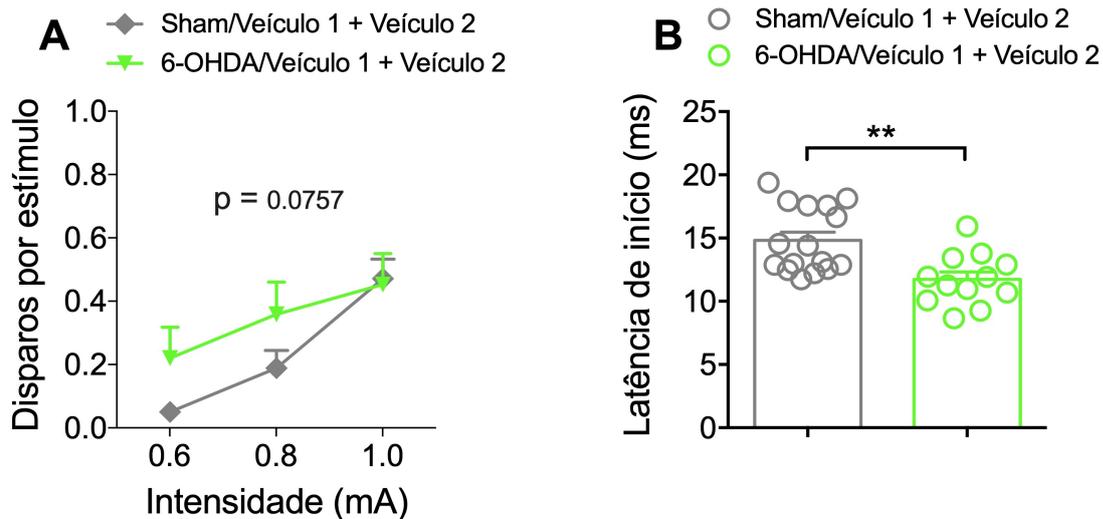


Figura 14: Efeitos da lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA nos disparos evocados corticalmente nos MSNs e sobre a latência de início de disparo.

(A) Não houve efeito significativo observado entre os animais lesionados (6-OHDA) e sham na quantidade de disparos dos MSNs evocados por estímulo cortical ($p > 0,05$; ANOVA de duas vias repetidas seguida de *post hoc* de Holm Sidak); (B) Foi observada uma diminuição significativa na latência de início dos disparos evocados corticalmente nos MSNs dos animais lesionados (6-OHDA) ($p < 0,003$; teste t não-pareado). Os dados estão apresentados como média \pm SEM. Número de células: Sham/Veículo 1 + Veículo 2 ($n = 16$), 6-OHDA/Veículo 1 + Veículo 2 ($n = 12$).

EFEITOS DA LESÃO DOPAMINÉRGICA INDUZIDA POR 6-OHDA NA ATIVIDADE ESPONTANEA NOS MSNS ESTRIATAIS

Analisamos também como a lesão causada pela 6-OHDA interfere na porcentagem de células que responderam ao estímulo cortical e estavam quiescentes (Q) ou disparando (F) no corpo estriado, bem como, a taxa de disparos espontâneos por segundo dos MSNs estriatais. Os resultados não demonstraram diferença estatisticamente significativa na porcentagem de células estavam quiescentes ou disparando entre os animais lesionados e não lesionados ($p = 0,7015$) (Figura 15-A), também não demonstraram diferença significativa entre os grupos na taxa de disparos por segundos dos MSNs estriatais ($F_{13,17} = 1,508$; $p = 0,6662$; Figura 15-B).

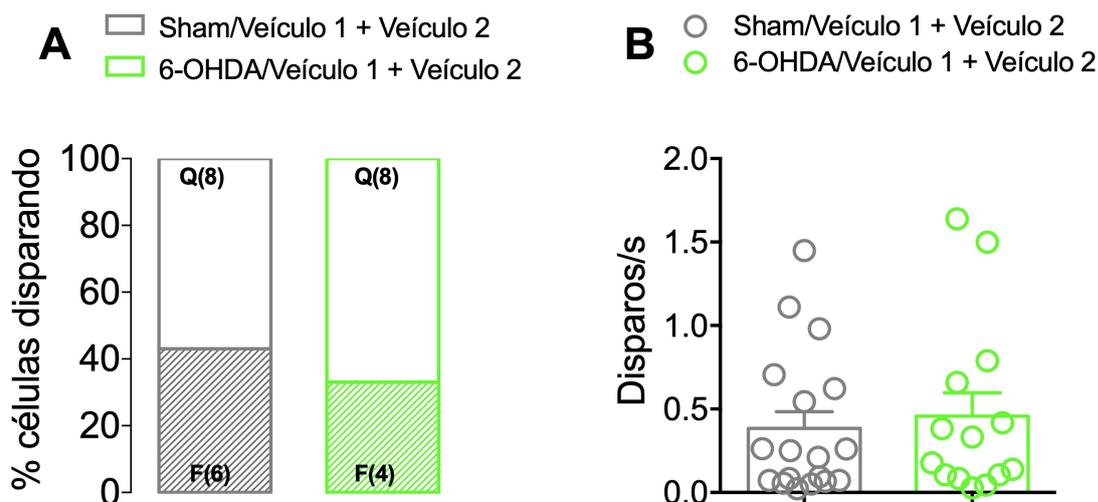


Figura 15: Efeitos da lesão dopaminérgica induzida por 6-OHDA nos disparos espontâneos nos MSNs no estriado.

(A) Não foi observada diferença significativa na porcentagem de células que responderam a estímulos corticais e estavam quiescentes (Q) ou disparando (F) no estriado entre ratos lesionados (6-OHDA) e sham ($p=0,7015$; Qui-quadrado e teste de Fisher); (B) Os animais que foram lesionados por 6-OHDA não apresentaram diferença significativa na taxa de disparos espontâneos por segundos dos MSNs ($p=0,662$; teste t não pareado). Os dados estão apresentados como média \pm SEM. Número de células: Sham/Veículo 1 + Veículo 2 ($n = 14$), 6-OHDA/Veículo 1 + Veículo 2 ($n = 12$).

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE DOS MSNS EVOCADA PELO CÓRTEX

Posteriormente, analisamos como a coadministração de ME3398 (1 mg/kg e 3 mg/kg) com L-DOPA interfere na atividade dos MSNs estriatais que respondem aos estímulos corticais. O resultado das análises da quantidade de disparos por estímulos demonstrou que houve efeito para o fator tratamento ($F_{3,78} = 6,162$; $p < 0,001$) e para o fator intensidade de corrente ($F_{2,78} = 17,99$; $p < 0,0001$), porém não houve interação entre o fator tratamento e intensidade de corrente ($F_{6,78} = 0,2314$; $p > 0,05$). O teste *post hoc* de Holm Sidak revelou que o ME3398 (3 mg/kg) aumentou significativamente a probabilidade de disparos dos MSNs evocados por estímulo cortical quando comparados ao grupo controle não-lesionado sham tratado com veículo 1 e veículo 2 ($p=0,001$), ao grupo veículo + L-DOPA ($p < 0,04$) e ao grupo 6-OHDA tratado com ME3398 na dose de 1 mg/kg ($p = 0,001$; Figura 16-A). Esses resultados sugerem que a administração do ME3398 na dose de 3 mg/kg (mas não na dose de 1 mg/kg) provoque uma facilitação da neurotransmissão da via cortico-estriatal.

Analisamos também possíveis alterações na latência de início dos disparos evocados corticalmente entre os grupos do tratamento e não foram encontradas diferenças

estatisticamente significativas na latência de início dos MSNs ($F_{3,26} = 1,846$; $p > 0,05$; Figura 16-B).

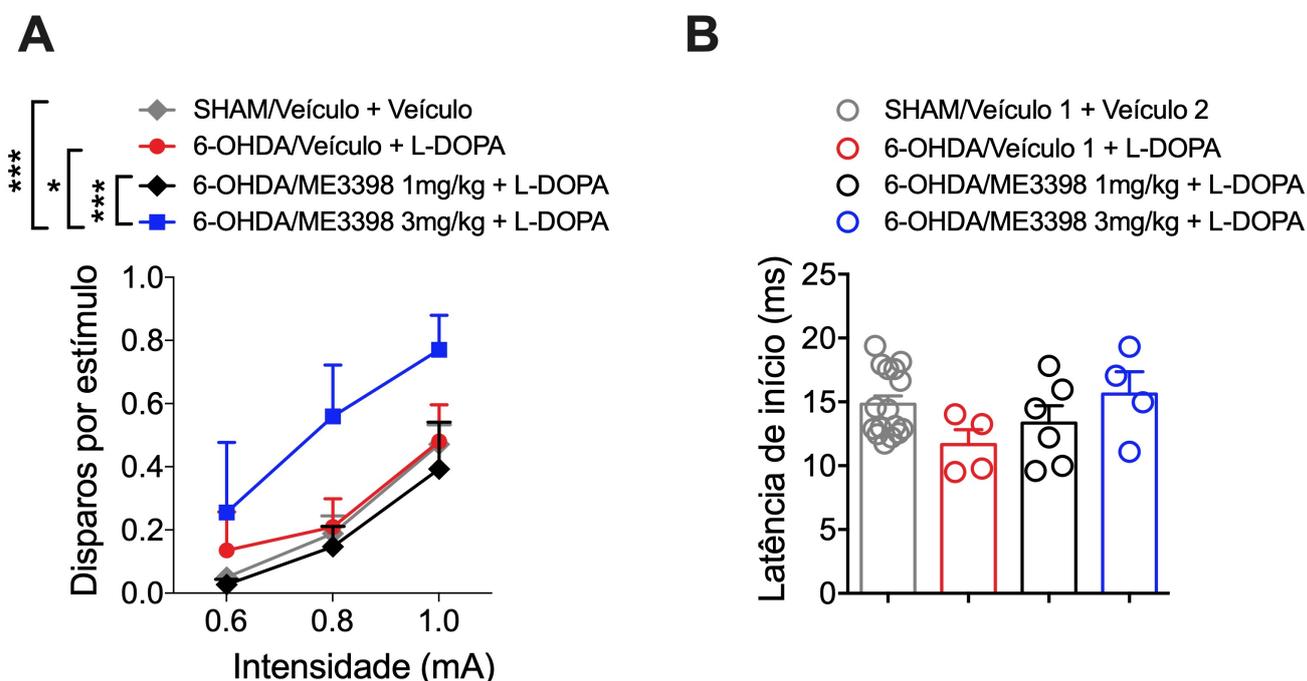


Figura 16: Efeitos da coadministração de L-DOPA e diferentes doses do ME3398 nos disparos evocados corticalmente nos MSNs e sobre a latência de início de disparo.

(A) As análises demonstraram que o ME3398 (3 mg/kg) aumentou significativamente a quantidade de disparos dos MSNs evocados por estímulo cortical (** $p=0,001$ vs Sham/Veículo 1 + Veículo 2; * $p > 0,05$ vs veículo + L-DOPA; ** $p=0,001$ vs 6-OHDA/ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA; ANOVA de duas vias seguida de teste *post hoc* de Holm Sidak). (B) Não foi observada diferença significativa na latência de início dos disparos dos MSNs evocados corticalmente entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Holm Sidak). Os dados estão apresentados como média \pm SEM. Número de células: Sham/Veículo 1 + Veículo 2 ($n = 16$), 6-OHDA/Veículo 1 + L-DOPA ($n = 4$), 6-OHDA/ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA ($n = 6$) e 6-OHDA/ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA ($n = 4$).

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE ESPONTÂNEA DOS MSNS

Por último, analisamos como a coadministração de ME3398 (1 mg/kg e 3 mg/kg) com L-DOPA interfere na taxa de disparos espontâneos por segundo dos MSNs estriatais. Os resultados demonstraram que não houve efeito significativo estatisticamente entre os grupos do tratamento ($F_{3,27} = 0,7684$; $p > 0,05$) (Figura 17).

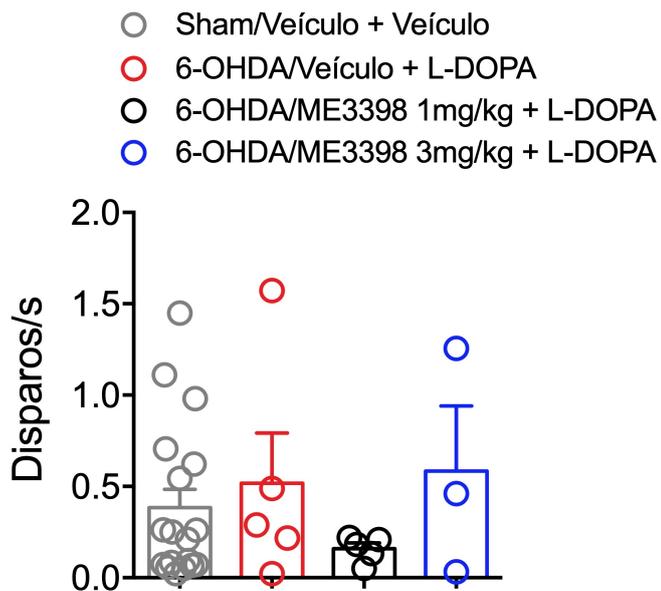


Figura 17: Efeitos da coadministração de L-DOPA e diferentes doses do MEE398 nos disparos espontâneos nos MSNs no estriado.

As análises demonstraram que não houve efeito significativo estatisticamente entre os grupos do tratamento ($p > 0,05$; ANOVA de uma via seguida de teste *post hoc* de Holm Sidak). Os dados estão apresentados como média \pm SEM (one-way ANOVA). Número de células: Sham/Veículo 1 + Veículo 2 ($n = 18$), 6-OHDA/Veículo 1 + L-DOPA ($n = 5$), 6-OHDA/ME3398 (1 mg/kg) + L-DOPA ($n = 5$) e 6-OHDA/ME3398 (3 mg/kg) + L-DOPA ($n = 3$).

5 DISCUSSÃO

Apesar da L-DOPA atualmente ser a farmacoterapia mais utilizada para o tratamento da DP, o desenvolvimento das discinesias após o tratamento a longo prazo muitas vezes se torna severa e mais prejudicial do que os próprios sintomas da doença, acarretando em danos na qualidade de vida do paciente. Em busca de reverter os prejuízos que as discinesias podem causar aos pacientes parkinsonianos, muitos estudos tentam elucidar os mecanismos fisiopatológicos que causam as LIDs para busca de novos tratamentos mais efetivos.

Neste trabalho, tivemos como objetivo investigar os mecanismos fisiopatológicos neuronais que estão relacionados ao comportamento discinético induzido pela L-DOPA através da inibição da enzima PDE10A. Nossos principais resultados sugerem que os animais tratados com ME3398 (3 mg/kg) apresentaram comportamento discinético prolongado e uma facilitação na neurotransmissão da via cortico-estriatal, enquanto animais tratados com ME3398 (1 mg/kg) diminuíram a incidência das LIDs e apresentaram neurotransmissão da via cortico-estriatal próximos a níveis basais. Não houve diferença estatística significativa para a quantidade de disparos dos MSNS, sugerindo então que o tratamento com ME3398 (3 mg/kg) e prolongamento das LIDs demonstraram apenas a facilitação da neurotransmissão da via cortico-estriatal. Nossos resultados também sugerem que a inibição da PDE10A pode reduzir ou prolongar a duração das discinesias, a depender da dose utilizada no tratamento. Além disso, a capacidade do inibidor ME3398 de diminuir as discinesias na dose de 1 mg/kg, pode ser vista como um alvo terapêutico para inovação da farmacoterapia no tratamento das discinesias induzidas pela L-DOPA.

Tivemos como um dos objetivos do trabalho avaliar a acinesia dos membros anteriores e, se a administração do ME3398 poderia interferir no efeito antiparkinsoniano da L-DOPA através do teste de caminhada. Nossos resultados demonstraram que a administração da L-DOPA conseguiu restaurar a acinesia dos membros anteriores nas 3 semanas do tratamento dos animais que foram tratados com veículo e L-DOPA. O grupo tratado com ME3398 (1 mg/kg) não apresentou resultado estatístico significativo, apesar de ter demonstrado uma tendência ao aumento na quantidade de passos na terceira semana do tratamento e possível recuperação do controle motor causada pela acinesia induzida pela DP. Esses dados podem sugerir uma possível interferência do ME3398 no efeito antiparkinsoniano da L-DOPA, porém, a tendência ao aumento dos passos na terceira semana do tratamento talvez possa ser confirmada estatisticamente com o aumento da amostra. Os resultados do grupo tratado com o ME3398 (3 mg/kg) não apresentaram diferença estatística durante as 3 semanas do tratamento, e, ao contrário do observado no grupo tratado com a dose de 1 mg/kg, demonstrou diminuir a quantidade de passos durante as semanas do tratamento. Esse resultado pode estar relacionado

com dois principais fatores, o primeiro é de que a coadministração com o ME3398 pode estar interferindo no efeito antiparkinsoniano da L-DOPA, e o segundo, hipótese mais consistente que acreditamos, seria de que a elevada incidência das discinesias observadas pelos experimentadores durante a realização do teste de caminhada teria atrapalhado a boa realização do teste, o que nos impediu de avaliar com precisão a acinesia dos animais durante o experimento. Entretanto, os grupos experimentais apresentaram níveis da incidência das discinesias semelhantes após 60 minutos do tratamento e o grupo veículo + L-DOPA foi capaz de melhorar a performance no teste de caminhada. Sendo assim, fica clara a necessidade de uma maior investigação a respeito do tratamento com ME3398 e sua relação com o efeito antiparkinsoniano da L-DOPA.

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NO COMPORTAMENTO DISCINÉTICO

Drogas que interferem na disponibilidade de nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc) vêm sendo amplamente estudadas como potenciais alvos terapêuticos para o tratamento das discinesias induzidas pela L-DOPA. Um estudo publicado em 2008, quantificou os níveis de AMPc e GMPc no córtex, estriado e globo pálido durante as discinesias induzidas pela L-DOPA e constatou que os níveis dos nucleotídeos cíclicos diminuíram no pico da incidência das LIDs. Além disso, o tratamento com zaprinast, um inibidor não-seletivo de PDEs, foi capaz de reduzir a incidência das LIDs e prevenir a diminuição dos níveis de nucleotídeos cíclicos (GIORGI et al., 2008). Outros estudos com inibidores não-seletivos de PDEs como o zaprinast e UK- 343664, acarretaram em efeito semelhante e diminuíram a incidência das LIDs (PICCONI et al., 2011; SOLÍS et al., 2015). Com base nesses dados, é plausível hipotetizar que drogas que aumentam a disponibilidade de nucleotídeos cíclicos poderiam atenuar as LIDs.

As análises dos comportamentos discinéticos comparando o desenvolvimento das discinesias durante as 3 semanas de tratamento, apesar de não terem demonstrado diferenças estatísticas significativas, apresentaram uma tendência a resultados diferentes dependendo da dose do inibidor da PDE10A. A dose de 1 mg/kg apresentou tendência à diminuição das discinesias, enquanto a dose de 3 mg/kg apresentou uma tendência ao aumento.

As análises temporais da coadministração do ME3398 com a L-DOPA, demonstraram que a tendência ao aumento das discinesias observado na comparação semanal do grupo tratado com ME3398 (3 mg/kg) é, na verdade, um resultado do prolongamento da duração das LIDs.

O grupo tratado com ME3398 (3 mg/kg) prolongou o pico da incidência das LIDs em 120 minutos (nas discinesias do membro anterior e na soma total das discinesias) e em 150 minutos (nos três tipos de discinesias e na soma total). Por outro lado, o grupo tratado com ME3398 (1 mg/kg) reduziu os três tipos de discinesias e a soma total em 90 minutos após a administração da L-DOPA.

É importante ressaltar que inibidores da PDE10A atuam concomitantemente como agonistas do tipo D1 e antagonistas do tipo D2 (MEGENS et al., 2014). Além disso, uma série de estudos vem demonstrando que a inibição da PDE10A teria uma preferência pela atuação na via indireta, ou seja, atuando principalmente como “antagonista” dos receptores do tipo D2 (NISHI et al., 2008; POLITO et al., 2015; THRELFELL et al., 2009; WILSON et al., 2015). Esses resultados sugerem que inibidores da PDE10A aumentariam a atividade da via indireta do controle motor, o que ocasionaria em menor comportamento discinético e está de acordo com os resultados obtidos no tratamento com ME3398 (1 mg/kg). Sugerimos ainda que o tratamento com ME3398 (3 mg/kg) pode ter aumentado também a atividade da via direta, o que causou o prolongamento das LIDs.

Os resultados obtido neste trabalho podem reforçar a discussão de que inibidores da PDE10A podem estimular ou inibir o comportamento motor dos animais dependendo do nível de ativação das vias direta e indireta que se projetam a partir do estriado, como previamente descrito (MEGENS et al., 2014). Esse estudo demonstrou que a inibição das PDE10As pode reverter o comportamento suprimido e até mesmo estimular o comportamento, dependendo do estado de ativação relativa das vias direta e indireta. No trabalho de Megens e et al., (2014), quando a atividade dos MSNs da via direta foi reduzida por um antagonista do receptor do tipo D1 (induzindo catalepsia nos animais), os inibidores da PDE10A potencializaram a catalepsia, aumentando as ações inibitórias da via indireta e atuando como um antagonista do receptor do tipo D2. Por outro lado, quando a catalepsia foi induzida por meio de um antagonista do tipo D2 (haloperidol), os inibidores da PDE10A agiram como agonista do tipo D1, revertendo a catalepsia induzida nos animais (MEGENS et al., 2014).

A diminuição temporal das discinesias foi descrita também com a administração de outro inibidor da enzima PDE10A chamado de MR1916, em estudos anteriores encontrados na literatura. Um desses estudos, foi realizado em 5 macacos com lesão induzida por MPTP, e demonstrou que o tratamento de 5 semanas com MR1916 e L-DOPA foi capaz de reduzir as discinesias e não interferiu nos efeitos antiparkinsonianos da L-DOPA (BECK et al., 2018). Outro estudo demonstrou ainda que o MR1916 em conjunto com a L-DOPA também foi capaz de reduzir as discinesias totais em modelo animal de ratos parkinsonianos induzidos por 6-

OHDA. Além disso, demonstrou-se também que o MR1916 não interferiu nos efeitos antiparkinsonianos da L-DOPA através da aplicação do teste de caminhada (ARAKAWA et al., 2020).

Os inibidores da PDE10A têm se tornado alvos terapêuticos para doenças neurológicas como Huntington e esquizofrenia. Alguns inibidores passaram por testes pré-clínicos e clínicos com bons resultados, sugerindo o potencial terapêutico desses inibidores (THRELFELL; WEST, 2013). Assim, em conjunto com os resultados previamente apresentados, acreditamos que o tratamento com ME3398 e a L-DOPA seja um alvo importante no estudo de novos tratamentos das discinesias induzidas pela L-DOPA em pacientes parkinsonianos.

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE ESPONTÂNEA DOS MSNS

Estudos que caracterizam eletrofisiologicamente a atividade espontânea dos MSNs, têm sido essenciais para compreender os mecanismos fisiológicos que acometem os distúrbios do controle motor que ainda não estão muito bem elucidados. É sabido que em modelos animais da DP há um aumento na taxa de disparos dos neurônios da via indireta, enquanto na via direta é observada uma diminuição da taxa de disparos, sugerindo que a depleção da dopamina causa um desequilíbrio entre as populações de neurônios estriatais, ocasionando em maior excitabilidade da via indireta e supressão da via direta (MALLETT et al., 2006). O resumo total da somatória da diminuição/aumento da taxa de disparo das diferentes subpopulações de MSNs do estriado pode ter relação com o resultado apresentado neste trabalho, em que não houve diferença na taxa de disparos dos MSNs em modelos animais da DP quando comparados ao grupo controle não lesionado, visto que em nossa análise não foi possível discriminar neurônios da via direta e indireta e o que obtivemos foi um resultado total das alterações que aconteceram no estriado.

Por outro lado, um estudo publicado posteriormente por outro grupo, não demonstrou aumento significativo da taxa de disparos dos neurônios que compõem a via indireta, apenas uma diminuição da taxa de disparos dos neurônios da via direta, o que poderia acarretar numa provável diminuição da atividade total apresentada no estriado, resultado que contrastaria com os resultados apresentados neste trabalho (RYAN et al., 2018).

A mesma divergência aconteceu em estudos com pacientes humanos da doença de Parkinson. Um estudo publicado em 2016 durante a realização da cirurgia de estimulação

cerebral profunda, revelou um aumento abrupto na taxa de disparo dos MSNs estriatais de pacientes da DP quando comparado a pacientes que possuem níveis basais de disparo, sugerindo que a atividade de MSNs estriatais em humanos também é alterada como sugerem alguns estudos em modelo animal (SINGH et al., 2016). Entretanto, outro estudo não revelou diferenças significativas nas taxas de disparo dos MSNs em pacientes com DP que se submeterem a mesma cirurgia (VALSKY et al., 2020). Assim, é evidenciada a necessidade de uma maior investigação a respeito da microcircuitaria que envolve os MSNs estriatais bem como a sua influência em distúrbios do movimento como a DP.

Além do estriado ser considerado uma peça-chave no estudo dos mecanismos fisiopatológicos da DP, ele é também conhecido na literatura como o principal alvo neuroanatômico relacionado às LIDs. Um estudo que relaciona o estriado às LIDs demonstrou que a administração local de L-DOPA no estriado foi capaz de induzir discinesias instantaneamente em modelo experimental da DP em ratos, ou seja, o estriado é uma peça chave tanto para o estudo da DP quanto para o surgimento das LIDs (BUCK et al., 2009)

Através de registros eletrofisiológicos unitários extracelulares *in vivo* nós buscamos responder duas perguntas chave: (1) Qual a influência do tratamento crônico com L-DOPA e (2) da coadministração de ME3398, em duas diferentes doses, com a L-DOPA na atividade espontânea dos neurônios espinhosos médios (MSNs) estriatais de animais discinéticos.

Para que fosse possível limitar a análise aos MSNs e distingui-los de outras populações neuronais do estriado, utilizamos estudos anteriores que caracterizaram as propriedades eletrofisiológicas de neurônios identificados neuroquimicamente no estriado. Sendo assim, os MSNs foram caracterizados seguindo como principal parâmetro a duração do sinal do potencial de ação dos MSNs que, em média, apresentaram duração de aproximadamente 1,20 ms, enquanto interneurônios parvalbumina-positivo, por exemplo, apresentam duração inferior a 1 ms (SHAROTT et al., 2012).

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa na atividade espontânea dos MSNs estriatais nos animais lesionados por 6-OHDA que foram tratados com L-DOPA e desenvolveram discinesias. Porém, esse resultado não está de acordo com esperado e com diversos estudos que relacionam a atividade anormal no estriado a incidência das discinesias. Sugerimos que esse resultado pode ter sido encontrado por não termos diferenciado os neurônios da via indireta e direta por problemas técnicos. Assim, ao registrar neurônios da via direta com maior atividade e neurônios da indireta com menor atividade, obtivemos um resultado geral da atividade dos MSNs que não demonstrou diferenças significativas.

Diferenças significativas na atividade dos MSNs da via direta do controle motor de animais tratados cronicamente com L-DOPA foram encontradas por Ryan et al. (2018) em um estudo. Através de registros eletrofisiológicos unitários realizados em combinação com a técnica de optogenética, o estudo demonstrou que a administração crônica de L-DOPA modula a via direta do estriado, aumentando significativamente as taxas de disparos por segundo dos MSNs estriatais da via direta. Esse aumento foi correlacionado fortemente com o aumento severo das discinesias, analisadas através da quantificação dos AIMs. Foi demonstrado ainda que a ativação de neurônios da via direta através de optogenética foi capaz de causar comportamento discinético imediato nos animais. Outro trabalho do mesmo grupo (GIRASOLE et al., 2018), demonstrou também que a inibição de neurônios da via direta, foi capaz de reduzir o comportamento discinético dos animais.

Sendo assim, apesar de não termos conseguido demonstrar diferenças estatisticamente significativas na atividade dos MSNs estriatais entre os grupos, acreditamos que o complemento do trabalho com registro de um maior número de células nos leve ao mesmo resultado dos trabalhos apresentados anteriormente.

EFEITO DA COADMINISTRAÇÃO DO ME3398 COM L-DOPA NA ATIVIDADE DOS MSNS EVOCADA PELA ESTIMULAÇÃO CORTICAL

Com a finalidade de compreender a influência da atividade da via cortico-estriatal em condições patológicas, diversos estudos vêm sendo publicados relacionando distúrbios a atividades anormais na neurotransmissão da via cortico-estriatal. Um deles demonstrou que em modelo animal da DP com ratos lesionados por 6-OHDA, a depleção de dopamina não provocou mudanças significativas na quantidade de disparos evocados pelo córtex em neurônios da via direta. Porém, neurônios da via indireta apresentaram maior quantidade de disparos evocados pelo córtex, o que sugeriu uma facilitação da via indireta em modelo animal da DP (MALLET et al., 2006). Ademais, esses dados podem ter relação com os resultados obtidos neste trabalho, onde animais lesionados tratados com veículo demonstraram uma tendência ao aumento da quantidade de disparos evocados nos MSNs estriatais quando comparados a animais não lesionados, o que provavelmente está relacionado ao aumento exacerbado da excitabilidade da via indireta.

O estriado é um alvo de estudos para a compreensão da fisiopatologia das LIDs mas outras regiões do sistema nervoso central também estão envolvidas nessa disfunção. Uma região importante envolvida nas LIDs é o córtex motor primário (M1) (CENCI et al., 2018). Já foi demonstrado através de estudos com LFP (Potencial de Campo Local) que a atividade oscilatória cortical anormal estaria relacionada com as LIDs (BELIĆ et al., 2016; DUPRE et al., 2016). Além disso, demonstrou-se que as discinesias também estão relacionadas a déficits na neuroplasticidade do M1 (HUANG et al., 2011).

Muito do que se sabe sobre a influência da via cortico-estriatal nas LIDs é proveniente de estudos com imagem de ressonância magnética (MRI) em humanos, se fazendo necessário o aprimoramento de estudos em modelo animal. Uma série de estudos em pacientes com PD e LID vem demonstrando através da MRI que a atividade cortical está hiperativada ou desregulada (CERASA et al., 2015; HERZ et al., 2015, 2016), porém ainda não se sabe a causa dessa hiperatividade na neurotransmissão da via (CENCI et al. 2018).

Estudos em modelos animais nos permitem aprofundar nas investigações da origem das anormalidades da neurotransmissão da via cortico-estriatal a nível molecular e celular. Uma das formas de se estudar essa via é através de registros eletrofisiológicos extracelulares e manipulação da disponibilidade de nucleotídeos cíclicos através da inibição da enzima PDE10A. Um estudo publicado em 2009, demonstrou através de registros eletrofisiológicos que a inibição da PDE10A com o inibidor TP-10 foi capaz de aumentar a excitabilidade da via indireta, enquanto não apresentou alterações na atividade da via direta (THRELFELL et al. 2009). Acreditamos que esse resultado é o mesmo que acontece com o tratamento com ME3398 (1 mg/kg), que foi capaz de apresentar efeito anti-discinético.

Entretanto, nenhum estudo investigou qual a influência da inibição da PDE10A na modulação da transmissão da via cortico-estriatal durante as discinesias induzidas pela L-DOPA por meio de registros eletrofisiológicos. Além disso, como descrito previamente nesta sessão, alguns estudos demonstraram que a inibição da PDE10A pode estimular ou suprimir o movimento, a depender do nível de ativação da projeção dos neurônios do estriado. Sendo assim, é necessário investigar a influência da inibição da PDE10A na atividade da via cortico-estriatal e na incidência das LIDs.

Com o objetivo de estudar a influência da modulação da via cortico-estriatal e a influência da inibição da PDE10A sobre os comportamentos discinéticos em modelo animal, realizamos eletrofisiologia extracelular *in vivo* para registrar a atividade dos MSNs estriatais, desta vez, evocada por estímulos no córtex motor primário. Por meio desses registros nós analisamos: (1) Qual a influência do tratamento crônico com L-DOPA e (2) da coadministração

de ME3398, em duas diferentes doses, com a L-DOPA na atividade dos MSNs evocada pelo córtex.

Os resultados obtidos nos levam a acreditar que a coadministração crônica da L-DOPA com o ME3398 na dose de 3 mg/kg animais lesionados por 6-OHDA, tenha causado uma possível facilitação da via cortico-estriatal, devido ao aumento da quantidade de disparos por estímulos corticais. Esse tratamento foi capaz de prolongar o comportamento discinético nos animais, o que nos leva a considerar uma possível relação entre a facilitação da transmissão da via cortico-estriatal e a maior duração das incidências das discinesias. Esse resultado é equivalente aos resultados obtidos anteriormente por estudo publicado pelo nosso grupo, em que foi demonstrado através de eletrofisiologia extracelular *in vivo* que a administração sistêmica de TP-10 aumentou a probabilidade de disparo dos MSNs evocados pelo córtex motor primário em ratos, sugerindo que a inibição da PDE10A causaria uma facilitação da via cortico-estriatal (PADOVAN-NETO et al., 2015), como o encontrado neste trabalho no grupo que recebeu a dose de 3 mg/kg do ME3398.

Ademais, esse resultado também pode ter relação com resultados obtidos por um grupo (GUERRA et al., 2019) que demonstrou que a atividade de circuitos intracorticais específicos também está facilitada durante as LIDs. O estudo foi realizado através de uma combinação de protocolos de estimulação magnética transcraniana no córtex motor primário de humanos discinéticos. O resultado foi coletado durante o efeito da L-DOPA e sugere que a neurotransmissão glutamatérgica está hiperativa em circuitos específicos do M1, pois essa disfunção foi restaurada através da administração da safinamida, droga que possui propriedades anti-glutamatérgicas.

Nossas análises sugerem uma relação íntima entre a transmissão da via cortico-estriatal e a duração das LIDs. O aumento da duração das discinesias, observado no grupo tratado com ME3398 (3 mg/kg), parece estar relacionado com uma facilitação da via cortico-estriatal, enquanto a diminuição das discinesias, observada no grupo tratado com ME3398 (1 mg/kg) apresenta atividade da via cortico-estriatal similares a níveis basais. Esses resultados são uma novidade na literatura e nos conhecimentos a respeito das discinesias induzidas pela L-DOPA.

LIMITAÇÕES DO TRABALHO

Caracterização dos MSNs da via direta e indireta

Uma das dificuldades encontradas no trabalho foi a caracterização das vias direta e indireta do controle motor. A caracterização das vias seria importante para discussão a respeito de como acontece a modulação das atividades das vias sob a inibição da PDE10A e poder conjugar os resultados com as análises obtidas nos de testes comportamentais. A conjugação desses resultados nos possibilitaria compreender o que acontece a nível neurofisiológico na atividade individual de cada uma das vias no caso de diminuição ou prolongamento da duração das discinesias. A principal dificuldade encontrada na caracterização das vias foi em conseguir registrar neurônios que respondessem concomitantemente para a estimulação cortical e estimulação antidrômica da SNr. O protocolo de estimulação antidrômica, consiste em gerar potenciais de ação na SNr, possibilitando observar a resposta do neurônio concomitantemente ao estímulo do córtex e da SNr, o que nos permitira caracterizar um neurônio da via direta, que se projeta diretamente dos MSNs para a SNr. Outra possibilidade é que durante os registros fomos viesados a encontrar em sua maioria neurônios da via indireta, que não eram possíveis de se identificar através de estimulação antidrômica.

Imunohistoquímica

Com objetivo de confirmar as lesões por 6-OHDA nos animais que foram previamente demonstradas através do teste de caminhada, estamos realizando imunohistoquímica para marcação da enzima tirosina-hidroxilase com o intuito de quantificar os neurônios dopaminérgicos dos animais utilizados neste trabalho. Esse resultado contribuirá com a discussão do trabalho e estará presente em futuras publicações.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que o ME3398 demonstrou ter efeito dose-dependente. O tratamento crônico com a dose de 1 mg/kg foi capaz de reduzir as LIDs no pico de incidência e manteve níveis basais na atividade da via cortico-estriatal. O tratamento com a dose de 3 mg/kg prolongou a duração da incidência das LIDs até 150 minutos após a administração da L-DOPA e facilitou a neurotransmissão da via cortico-estriatal. Não foram demonstradas diferenças na atividade espontânea dos MSNs no estriado entre os grupos amostrais. Portanto, acreditamos que esses resultados ajudarão a elucidar os conhecimentos neurofisiológicos e a influência da PDE10A sobre a incidência das LIDs.

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, E. D.; BONATZ, A. E.; ZIGMOND, M. J. Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. *Brain research*, v. 525, n. 1, p. 36–44, 13 ago. 1990.

ARAKAWA, K.; YUGE, N.; MAEHARA, S. Ameliorative effects of a phosphodiesterase 10A inhibitor, MR1916 on l -DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Pharmacological Reports 2020 72:2*, v. 72, n. 2, p. 443–448, 6 mar. 2020.

BECK, G. et al. A Selective Phosphodiesterase 10A Inhibitor Reduces L -Dopa-Induced Dyskinesias in Parkinsonian Monkeys. *Movement Disorders*, v. 33, n. 5, p. 805–814, maio 2018.

BELIĆ, J. J. et al. Untangling Cortico-Striatal Connectivity and Cross-Frequency Coupling in L-DOPA-Induced Dyskinesia. *Frontiers in systems neuroscience*, v. 10, p. 26, 2016.

BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews*, v. 58, n. 3, p. 488–520, set. 2006.

BJORKLUND; A. Dopamine-containing system in the CNS. *Handbook of chemical neuroanatomy*, v. 2, p. 55–122, 1984.

BUCK, K.; FERGER, B. Comparison of intrastriatal administration of noradrenaline and l-DOPA on dyskinesic movements: a bilateral reverse in vivo microdialysis study in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience*, v. 159, n. 1, p. 16–20, 3 mar. 2009.

CALABRESI, P. et al. Levodopa-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. *The Lancet. Neurology*, v. 9, n. 11, p. 1106–17, nov. 2010.

CARTA, M. et al. Role of striatal l-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Journal of Neurochemistry*, v. 96, n. 6, p. 1718–1727, 1 mar. 2006.

CENCI, M. A. Dopamine dysregulation of movement control in L-DOPA-induced dyskinesia. *Trends in neurosciences*, v. 30, n. 5, p. 236–43, maio 2007.

CENCI, M. A.; JÖRNTELL, H.; PETERSSON, P. On the neuronal circuitry mediating L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, v. 125, n. 8, p. 1157–1169, 2018.

CENCI, M. A.; LEE, C. S.; BJÖRKLUND, A. L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *European Journal of Neuroscience*, v. 10, n. 8, p. 2694–2706, 1 ago. 1998.

CERASA, A. et al. A network centred on the inferior frontal cortex is critically involved in levodopa-induced dyskinesias. *Brain : a journal of neurology*, v. 138, n. Pt 2, p. 414–27, fev. 2015.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. *The biochemical basis of neuropharmacology*. [s.l.] Oxford University Press, 2003.

DARMOPIŁ, S. et al. Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biological psychiatry*, v. 66, n. 6, p. 603–13, 15 set. 2009.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, v. 39, n. 6, p. 889–909, 11 set. 2003.

DELONG, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, v. 13, n. 7, p. 281–285, 1 jul. 1990.

DELONG, M. R.; WICHMANN, T. *Circuits and Circuit Disorders of the Basal Ganglia*. *Archives of Neurology*, v. 64, n. 1, p. 20, 1 jan. 2007.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology & medicine*, v. 62, p. 132–144, set. 2013.

DONG, J. et al. Current Pharmaceutical Treatments and Alternative Therapies of Parkinson's Disease. *Current neuropharmacology*, v. 14, n. 4, p. 339–55, 2016.

DUPRE, K. B. et al. Effects of L-dopa priming on cortical high beta and high gamma oscillatory activity in a rodent model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, v. 86, p. 1–15, fev. 2016.

FILION, M.; TREMBLAY, L. Abnormal spontaneous activity of globus pallidus neurons in monkeys with MPTP-induced parkinsonism. *Brain Research*, v. 547, n. 1, p. 140–144, 26 abr. 1991.

GERFEN, C. R. Et al. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science (New York, N.Y.)*, v. 250, n. 4986, p. 1429–32, 7 dez. 1990.

GERFEN, C. R.; HERKENHAM, M.; THIBAUT, J. The neostriatal mosaic: II. Patch- and matrix-directed mesostriatal dopaminergic and non-dopaminergic systems. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 7, n. 12, p. 3915–34, dez. 1987.

GIBB, W. R.; LEES, A. J. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, v. 51, n. 6, p. 745–52, jun. 1988.

GIORGI, M. et al. Lowered cAMP and cGMP signalling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms. *European Journal of Neuroscience*, v. 28, n. 5, p. 941–950, 1 set. 2008.

GIRASOLE, A. E. et al. A Subpopulation of Striatal Neurons Mediates Levodopa-Induced Dyskinesia. *Neuron*, v. 97, n. 4, p. 787- 795.e6, 2018.

GUERRA, A. et al. Abnormal cortical facilitation and L-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Brain stimulation*, v. 12, n. 6, p. 1517–1525, 2019.

HERZ, D. M. et al. Abnormal dopaminergic modulation of striato-cortical networks underlies levodopa-induced dyskinesias in humans. *Brain*, v. 138, n. 6, p. 1658–1666, 1 jun. 2015.

HERZ, D. M. et al. Resting-state connectivity predicts levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, v. 31, n. 4, p. 521–9, abr. 2016.

HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. *Journal of neurology*, v. 257, n. Suppl 2, p. S249-52, nov. 2010.

HUANG, Y.-Z. et al. Abnormal bidirectional plasticity-like effects in Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology*, v. 134, n. Pt 8, p. 2312–20, ago. 2011.

JANKOVIC, J.; TAN, E. K. Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, v. 91, p. 795–808, 2020.

JAYASINGHE, V. R. et al. Frequency-Dependent Corticostriatal Disinhibition Resulting from Chronic Dopamine Depletion: Role of Local Striatal cGMP and GABA-AR Signaling. *Cerebral Cortex*, v. 27, n. 1, p. bhv241, 27 out. 2015.

JENNER, P. Avoidance of dyskinesia: preclinical evidence for continuous dopaminergic stimulation. *Neurology*, v. 62, n. 1 Suppl 1, p. S47-55, 13 jan. 2004.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 9, p. 665–77, set. 2008.

KAWAGUCHI, Y. et al. Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization. *Trends in Neurosciences*, v. 18, n. 12, p. 527–535, dez. 1995.

KELLY, M. P. et al. Select 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases exhibit altered expression in the aged rodent brain. *Cellular Signalling*, v. 26, n. 2, p. 383–397, 1 fev. 2014.

KETOLA, M. Applying the Common Model of Cognition to Resting-State fMRI Leads to the Identification of Abnormal Functional Connectivity in Parkinson's Disease Applying the

Common Model of Cognition to Resting-State fMRI Leads to the Identification of Abnormal Func. n. May, 2020.

KOSTIC, V. et al. Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease. *Neurology*, v. 41, n. 2 (Pt 1), p. 202–5, 1 fev. 1991.

LINAZASORO, G. New ideas on the origin of L-dopa-induced dyskinesias: age, genes and neural plasticity. *Trends in pharmacological sciences*, v. 26, n. 8, p. 391–7, ago. 2005.

LINDENBACH, D. et al. The Role of Primary Motor Cortex (M1) Glutamate and GABA Signaling in l-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinsonian Rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 36, n. 38, p. 9873–87, 2016.

LUNDBLAD, M. et al. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, v. 15, n. 1, p. 120–32, jan. 2002.

MALEK, N. Deep Brain Stimulation in Parkinson's Disease. *Neurology India*, v. 67, n. 4, p. 968–978, 2019.

MALLET, N. et al. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 26, n. 14, p. 3875–84, 5 abr. 2006.

MARSDEN, C. D.; PARKES, J. D.; QUINN, N. Fluctuations of disability in Parkinson's disease – clinical aspects. *Movement Disorders*, p. 96–122, 1 jan. 1981.

MEGENS, A. A. H. P. et al. Pharmacology of JNJ-42314415, a centrally active phosphodiesterase 10A (PDE10A) inhibitor: a comparison of PDE10A inhibitors with D2 receptor blockers as potential antipsychotic drugs. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 349, n. 1, p. 138–54, abr. 2014.

MONS, N. et al. Ca²⁺-sensitive adenylyl cyclases, key integrators of cellular signalling. *Life Sciences*, v. 62, n. 17–18, p. 1647–1652, mar. 1998.

MORIZANE, A. [Cell therapy for Parkinson's disease with induced pluripotent stem cells]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology*, v. 59, n. 3, p. 119–124, 28 mar. 2019.

NAMBU, A.; TOKUNO, H.; TAKADA, M. Functional significance of the cortico–subthalamo–pallidal ‘hyperdirect’ pathway. *Neuroscience Research*, v. 43, n. 2, p. 111–117, 1 jun. 2002.

NISHI, A. et al. Distinct roles of PDE4 and PDE10A in the regulation of cAMP/PKA signaling in the striatum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 28, n. 42, p. 10460–71, 15 out. 2008.

OBESO, J. A. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 23 Suppl 3, p. S548-59, 2008.

OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, set. 2017.

OLSSON, M. et al. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 15, n. 5 Pt 2, p. 3863–75, maio 1995.

OSTER, K. A.; SORKIN, S. Z. Effects of Intravenous Injections of L-Dopa upon Blood Pressure. *Experimental Biology and Medicine*, v. 51, n. 1, p. 67–70, 1 out. 1942.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Facilitation of Corticostriatal Transmission following Pharmacological Inhibition of Striatal Phosphodiesterase 10A: Role of Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Pathways. *Journal of Neuroscience*, v. 35, n. 14, p. 5781–5791, 8 abr. 2015.

PADOVAN-NETO, F. E.; WEST, A. R. Regulation of Striatal Neuron Activity by Cyclic Nucleotide Signaling and Phosphodiesterase Inhibition: Implications for the Treatment of Parkinson's Disease. In: *Advances in neurobiology*. [s.l: s.n.]. v. 17p. 257–283.

PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, v. 37, n. 3, p. 313–9, maio 2010.

PEREZ-LLORET, S.; RASCOL, O. Efficacy and safety of amantadine for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, v. 125, n. 8, p. 1237–1250, 2018.

PFEIFFER, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, v. 22, p. S119–S122, jan. 2016.

PICCONI, B. et al. Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain : a journal of neurology*, v. 134, n. Pt 2, p. 375–87, fev. 2011.

POLITO, M. et al. Selective Effects of PDE10A Inhibitors on Striatopallidal Neurons Require Phosphatase Inhibition by DARPP-32. *eNeuro*, v. 2, n. 4, 2015.

RAJPUT, A. H. et al. Clinical-Pathological study of levodopa complications. *Movement Disorders*, v. 17, n. 2, p. 289–296, 1 mar. 2002.

RYAN, M. B.; BAIR-MARSHALL, C.; NELSON, A. B. Aberrant Striatal Activity in Parkinsonism and Levodopa-Induced Dyskinesia. *Cell reports*, v. 23, n. 12, p. 3438- 3446.e5, 2018.

SANTINI, E. et al. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Science signaling*, v. 2, n. 80, p. ra36, 21 jul. 2009.

SEEGER, T. F. et al. Immunohistochemical localization of PDE10A in the rat brain. *Brain Research*, v. 985, n. 2, p. 113–126, 26 set. 2003.

SEIFERT, R.; SCHNEIDER, E. H.; BÄHRE, H. From canonical to non-canonical cyclic nucleotides as second messengers: pharmacological implications. *Pharmacology & therapeutics*, v. 148, p. 154–84, abr. 2015.

SHARMA, J. C.; BACHMANN, C. G.; LINAZASORO, G. Classifying risk factors for dyskinesia in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, v. 16, n. 8, p. 490–7, set. 2010.

SHAROTT, A. et al. Relationships between the firing of identified striatal interneurons and spontaneous and driven cortical activities in vivo. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, v. 32, n. 38, p. 13221–36, 19 set. 2012.

SINGH, A. et al. Human striatal recordings reveal abnormal discharge of projection neurons in Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 113, n. 34, p. 9629–34, 23 ago. 2016.

SIUCIAK, J. A. et al. Genetic deletion of the striatum-enriched phosphodiesterase PDE10A: evidence for altered striatal function. *Neuropharmacology*, v. 51, n. 2, p. 374–85, ago. 2006.

SMITH, Y. et al. The thalamostriatal system: a highly specific network of the basal ganglia circuitry. *Trends in neurosciences*, v. 27, n. 9, p. 520–7, set. 2004.

SOLÍS, O. et al. Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in *Pitx3*^{-/-} aphakia mice. *Neurobiology of Disease*, v. 73, p. 49–59, 1 jan. 2015.

SONG, J.-J. et al. Cografting astrocytes improves cell therapeutic outcomes in a Parkinson's disease model. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 128, n. 1, p. 463–482, 2 jan. 2018.

SPIGOLON, G.; FISONE, G. Signal transduction in L-DOPA-induced dyskinesia: from receptor sensitization to abnormal gene expression. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, v. 125, n. 8, p. 1171–1186, 2018.

STEECE-COLLIER, K. et al. Embryonic mesencephalic grafts increase levodopa-induced forelimb hyperkinesia in parkinsonian rats. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, v. 18, n. 12, p. 1442–54, dez. 2003.

STEINER, H.; TSENG, K. Y. *Handbook of basal ganglia structure and function*. [s.l.: s.n.].

SUDHAKAR, V.; RICHARDSON, R. M. Gene Therapy for Parkinson's Disease. **Progress in neurological surgery**, v. 33, p. 253–264, 2018.

TAYLOR, J. L.; BISHOP, C.; WALKER, P. D. Dopamine D1 and D2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, v. 81, n. 4, p. 887–93, ago. 2005.

THRELFELL, S. et al. Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, v. 328, n. 3, p. 785–95, mar. 2009.

THRELFELL, S.; WEST, A. R. Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal ganglia*, v. 3, n. 3, p. 137–146, 1 dez. 2013.

TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, v. 124, n. 8, p. 901–905, 2017.

VALSKY, D. et al. What is the true discharge rate and pattern of the striatal projection neurons in Parkinson's disease and Dystonia? *eLife*, v. 9, 19 ago. 2020.

WARREN OLANOW, C. et al. Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, v. 28, n. 8, p. 1064–71, jul. 2013.

WESTIN, J. E. et al. Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biological psychiatry*, v. 62, n. 7, p. 800–10, 1 out. 2007.

WILSON, J. M. et al. Phosphodiesterase 10A inhibitor, MP-10 (PF-2545920), produces greater induction of c-Fos in dopamine D2 neurons than in D1 neurons in the neostriatum. *Neuropharmacology*, v. 99, p. 379–386, 1 dez. 2015.

WINKLER, C. et al. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of disease*, v. 10, n. 2, p. 165–86, jul. 2002.

WIRDEFELDT, K. et al. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European journal of epidemiology*, v. 26 Suppl 1, p. S1-58, jun. 2011.

XIE, W.-R. et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. *Neuroscience*, v. 142, n. 3, p. 809–22, 27 out. 2006.

XILOURI, M.; BREKK, O. R.; STEFANIS, L. α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Molecular neurobiology*, v. 47, n. 2, p. 537–51, abr. 2013.