

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

Danilo Leandro Ribeiro

Efeitos do nitroprussiato de sódio na via córtico-estriatal durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA

Ribeirão Preto

2021

Danilo Leandro Ribeiro

Efeitos do nitroprussiato de sódio na via córtico-estriatal durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Psicobiologia.

Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Eduardo Padovan Neto

Ribeirão Preto

2021

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.

Ribeiro, Danilo Leandro

Efeitos do nitroprussiato de sódio na via córtico-estriatal durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA. Ribeirão Preto, 2021. 50 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientador: Padovan Neto, Fernando Eduardo.

Nome: Ribeiro, Danilo Leandro

Título: Efeitos do nitroprussiato de sódio na via córtico-estriatal durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Psicobiologia.

APROVADO EM: ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr _____ Instituição _____
Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr _____ Instituição _____
Julgamento _____ Assinatura _____

Prof. Dr _____ Instituição _____
Julgamento _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Silvia, fonte de força e inspiração, que sempre me apoiou nos estudos e em tudo que decidi fazer, com todo meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fernando Eduardo Padovan Neto pela sua orientação no desenvolvimento deste trabalho e pelo seus ensinamentos.

A todos os colegas de laboratório que contribuíram para a execução dos experimentos necessários para o desenvolvimento do projeto.

À FAPESP, pelo apoio financeiro concedido através do processo nº 2019/04188-0, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Teste de caminhada que avalia a acinesia nos animais antes, duas e quatro semanas depois da administração unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial	27
Figura 2. Análise dos movimentos involuntários anormais induzidos pelo tratamento crônico com 7-NI (30 mg/kg) e L-DOPA (5 mg/kg)	28
Figura 3. Análise dos movimentos involuntários anormais induzidos pelo tratamento crônico com ODQ (5 mg/kg) e L-DOPA (5 e 2,5 mg/kg)	30
Figura 4. Teste de caminhada que avalia a acinesia nos animais antes, duas e quatro semanas depois da administração unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial	31
Figura 5. Análise dos movimentos involuntários anormais induzidos pelo tratamento crônico com L-DOPA e Nitroprussiato de Sódio (NPS)	33
Figura 6. Teste de caminhada que avalia a acinesia nos animais durante o tratamento crônico	34
Figura 7. Análise dos efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na atividade dos MSNs estriatais	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AC	Adenilato ciclase
ACSF	Líquido cefalorraquidiano artificial
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
COMT	Catecol-O-metiltransferase
DP	Doença de Parkinson
DA	Doença de Alzheimer
DAT	Transportadores de dopamina
DMI	Desipramina
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FPM	Feixe prosencefálico medial
FSI	Interneurônios de disparo rápido
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
GTP	Trifosfato de Guanosina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
i.p	Intraperitoneal
L-DOPA	Levodopa
LIDs	Discinesias induzidas pela L-DOPA
L-NOARG	NG-nitro-L-arginine
LTD	Depressão de longa duração
LTP	Potenciação de longa duração
MAO-A	Monoamina oxidase tipo A
MAO-B	Monoamina oxidase tipo B
MSNs	Neurônios espinhosos médios
NAT	Transportadores de noradrenalina
NO	Óxido Nítrico

NOS	Óxido nítrico sintase
NADPH	Nicotinamida-adenina-dinucleotideo-fosfato
NMDA	N-metil D-Aspartato
NPS	Nitroprussiato de Sódio
NST	Núcleo Subtalâmico
ODQ	1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one
PB	Tampão fosfato
PDEs	Fosfodiesterases
PFA	Paraformaldeído
PKG	Proteínas quinases
s.c	Subcutâneo
SN	Substância Negra
SNc	Substância Negra compacta
SNr	Substância Negra reticulada
TH	Tirosina hidroxilase
6-OHDA	6- hidroxidopamina
7-NI	7- nitroindazole

RESUMO

RIBEIRO, D. L. **Efeitos do nitroprussiato de sódio na via córtico-estriatal durante a ocorrência das discinesias induzidas pela L-DOPA.** 2021. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda gradual de neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta. O tratamento visa a reposição dopaminérgica no estriado com o uso da L-DOPA. Entretanto, o uso crônico da L-DOPA pode levar ao surgimento de complicações motoras como as discinesias induzidas pela L-DOPA (LIDs). O estriado é composto principalmente pelos neurônios espinhosos médios (MSNs) que são divididos de acordo com seu alvo de projeção. A via direta (dMSNs) projeta-se para as porções motoras do globo pálido interno (GPi) e substância negra reticulada (SNr), enquanto a via indireta (iMSNs) projeta-se indiretamente para os núcleos de saída através de conexões com o globo pálido externo (GPe) e núcleo subtalâmico (NST). É sugerido que as LIDs surgem devido ao desequilíbrio na atividade dessas vias, ocorrendo uma hiperativação da via direta. O óxido nítrico (NO) está associado a modulação das vias de projeções estriatais através da sinalização nNOS-NO-GCs-GMPc. Nossa hipótese de trabalho é que o uso de inibidores e doadores de NO são capazes de reduzir a atividade exagerada da via córtico-estriatal e dessa maneira equilibrar a atividade das vias de saída do estriado atenuando as LIDs. As análises comportamentais das LIDs em ratos parkinsonianos utilizando os compostos ODQ e 7-NI (que inibem as enzimas guanilato ciclase solúvel (GCs) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), respectivamente) não apresentaram efeitos sobre as discinesias mesmo em diferentes doses de L-DOPA, em contraposição a estudos que mostram que estes inibidores possuem efeitos antidiscinéticos. A via de sinalização do NO é complexa e, tanto o aumento, quanto a diminuição dos níveis de GMPc podem apresentar efeitos antidiscinéticos. Assim, utilizamos o doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) para observar os efeitos desse fármaco sobre as LIDs. O tratamento com NPS (2 mg/kg) aumentou a incidência das discinesias quando comparado aos animais controle. Para avaliar a ação do NPS na atividade da via córtico-estriatal realizamos registros eletrofisiológicos in vivo em animais anestesiados. As análises evidenciaram uma facilitação na atividade da via córtico-estriatal nos animais tratados com NPS e L-DOPA quando comparados aos controles. Dessa maneira, nossos resultados sugerem que o aumento da sinalização da via do NO podem gerar uma hiperatividade nos MSNs e conseqüentemente o aumento das LIDs.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Óxido Nítrico, Nitroprussiato de Sódio, Eletrofisiologia.

ABSTRACT

RIBEIRO, D. L. **Effects of sodium nitroprusside on the corticostriatal pathway during the occurrence of L-DOPA-induced dyskinesias.** 2021. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021.

Parkinson's disease is characterized by the gradual loss of dopaminergic neurons from the substantia nigra pars compacta. Treatment is aimed at dopaminergic replacement in the striatum with the use of L-DOPA. However, the chronic use of L-DOPA can lead to motor complications such as L-DOPA-induced dyskinesias (LIDs). The striatum is mainly composed of medium spiny neurons (MSNs) that are divided according to their projection target. The direct pathway (dMSNs) projects to the motor portions of the inner pale globe (GPi) and cross-linked reticulated substantia nigra (SNr), while the indirect pathway (iMSNs) projects indirectly to the exit nuclei through connections with the globe pale external (GPe) and subthalamic nucleus (STN). It is suggested that LIDs arise due to the imbalance in the activity of these pathways, with hyperactivation of the direct path occurring. Nitric oxide (NO) is associated with the modulation of striatal projection pathways through nNOS-NO-sGC-cGMP signaling. Our working hypothesis is that the use of inhibitors and NO donors are able to reduce the exaggerated activity of the corticostriatal pathway and in this way balance the activity of the striatal output pathways, attenuating LIDs. Behavioral analyzes of LIDs in parkinsonian rats using the compounds ODQ and 7-NI (which inhibit the enzymes soluble guanylate cyclase (sGC) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS), respectively) had no effect on dyskinesias even at different doses of L-DOPA, in contrast to studies that show that these inhibitors have anti-dyskinetic effects. The NO signaling pathway is complex and both the increase and decrease in cGMP levels can have anti-dyskinetic effects. Thus, we used the NO donor sodium nitroprusside (SNP) to observe the effects of this drug on LIDs. Treatment with SNP (2 mg / kg) increased the incidence of dyskinesias when compared to control animals. To assess the action of SNP on the activity of the cortico-striatal pathway, we performed electrophysiological records in vivo in anesthetized animals. The analyzes showed a facilitation in the activity of the cortico-striatal pathway in the animals treated with NPS and L-DOPA when compared to the controls. Thus, our results suggest that the increased signaling of the NO pathway can generate hyperactivity in MSNs and, consequently, the increase in LIDs.

Key-words: Parkinson's Disease, Nitric Oxide, Sodium Nitroprusside, Electrophysiology.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Doença de Parkinson.....	12
1.2. Núcleos da base	13
1.3. Modelo animal da DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).	15
1.4. Sistema nitrérgico.	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral.....	20
2.2. Objetivo específico 1.....	20
2.3. Objetivo específico 2.....	20
3. METODOLOGIA	21
3.1. Aspectos Éticos.....	21
3.2. Teste de Caminhada.....	21
3.3. Cirurgia de indução do Parkinson experimental pela 6-OHDA.	21
3.4. Grupos de Tratamento e desenho experimental.....	22
3.5. Análise das discinesias induzidas pela L-DOPA (LIDs)	24
3.6. Eletrofisiologia	25
3.7. Perfusão	26
3.8. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Efeitos do 7-NI e ODQ nas discinesias induzidas pela L-DOPA.....	27
4.2. Efeitos do NPS nas discinesias induzidas pela L-DOPA	31
4.3. Eletrofisiologia	35
5. DISCUSSÃO	37
5.1. Efeitos do tratamento com ODQ e 7-NI na modulação das LIDs.	37
5.2. Efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na modulação das LIDs.....	38
5.3. Efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na excitabilidade dos MSNs	40
6. CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita inicialmente como uma síndrome por James Parkinson em sua monografia “Um Ensaio sobre a Paralisia Agitante” de 1817. Atualmente a DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum após a doença de Alzheimer (DA).

A etiologia da DP ainda é pouco conhecida, no entanto seu desenvolvimento provavelmente possui origens multifatoriais sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais (CACABELOS, 2017). A exposição do indivíduo a pesticidas como o paraquat e alguns metais pesados como o ferro e o chumbo também está associada ao desenvolvimento da DP (WIRDEFELDT et al., 2011; KUHN et al., 1998).

A DP é uma desordem neurológica complexa que é caracterizada pela morte precoce dos neurônios produtores de dopamina localizados em uma estrutura dos núcleos da base chamada substância negra compacta (SNc). O acúmulo de agregados da proteína α -sinucleína denominados corpos de Lewy também estão associados a neurodegeneração que ocorre na doença. A deficiência de dopamina no estriado como consequência da morte dos neurônios dopaminérgicos levam a sintomas motores e não motores (KALIA; LANG, 2015).

Parkinsonismo é definido como uma síndrome hipocinética e a principal causa do seu surgimento é a DP (MCFARLAND, 2016). No entanto, outras doenças ou lesões que afetam a disponibilidade de dopamina no estriado podem levar ao surgimento de sintomas motores, como: rigidez, tremores em repouso, lentidão ou ausência de movimentos voluntários e instabilidade postural (DAUER; PRZEDBORSK, 2003).

Os sintomas não motores, como a depressão, ansiedade e distúrbios do sono podem surgir antes mesmo dos sintomas motores. Além disso, foi demonstrado em estudos recentes que estes sintomas não motores possuem uma maior capacidade de impactar a qualidade de vida relacionada à saúde dos pacientes quando comparado aos sintomas motores (HAYES, 2019; MARTINEZ-MARTIN et al., 2011).

O principal tratamento sintomático para a DP tem como objetivo a reposição da dopamina no estriado, sendo o tipo de tratamento mais eficiente o uso do precursor da dopamina, a Levodopa (L-DOPA). Sua característica molecular, que permite a passagem através da barreira hematoencefálica, possibilitou a administração da droga por via oral (ABBOTT, 2010). O uso continuado da L-DOPA em pacientes parkinsonianos pode levar ao surgimento de complicações motoras conhecidas como discinesias induzidas pela L-DOPA (LIDs) (BASTIDE et al., 2015).

Os surgimentos das LIDs dependem do nível da degeneração dopaminérgica, das doses terapêuticas e do tempo de tratamento com L-DOPA (CENCI, 2014). Diferentes formas de LIDs são descritas de acordo com o padrão temporal dos movimentos involuntários relativos à ingestão de medicamentos, isto é, a distonia de período OFF (ocorre com a queda dos níveis plasmáticos de L-DOPA), as discinesias difásicas (início e fim da ação da L-DOPA) e as discinesias de pico de dose (ocorrem na metade do período útil de ação da L-DOPA) (FABBRINI et al., 2007)

Essas complicações podem ser muito debilitantes e comprometer a qualidade de vida de pacientes parkinsonianos. Por esta razão, outros tipos de drogas podem ser utilizados inicialmente para controlar os sintomas motores parkinsonianos como os agonistas de receptores dopaminérgicos pramipexol e o ropinirol e inibidores de monoaminas oxidase tipo B (MAO-B) como por exemplo a selegilina e a rasagilina (JANKOVIC; STACY, 2007; HAYES et al, 2019; FERRAZ, 2004).

1.2. Núcleos da base

Os núcleos da base são estruturas presentes no mesencéfalo que desempenham diversas funções, incluindo o controle motor, aprendizagem motora, comportamento e emoções (LANCIEGO; LUQUIN; OBESO, 2012). É composto pelo estriado (núcleo caudado e putâmen), globo pálido (porções interna e externa), pela substância negra reticulada (SNr), pela SNc e pelo núcleo subtalâmico (NST) (STOCCO; LEBIERE; ANDERSON, 2010).

O corpo estriado é o principal alvo de entrada de informações de outras estruturas dos núcleos da base, atuando de forma a integrar as informações sensoriais motoras vindas principalmente do córtex motor. Recebe importantes projeções

dopaminérgicas da SN que se degeneram durante a DP, como consequência dessa degeneração, as vias do controle motor ficam comprometidas (HARRIS et al., 2020).

O estriado é constituído pelos núcleos caudado e putâmen. A nível celular, o estriado é composto por interneurônios e, principalmente, pelos neurônios espinhosos médios (MSNs) que são categorizados em duas vias principais e são definidos de acordo com seus alvos de projeção (DELONG, 1990). A via direta (dMSN) surge de neurônios do estriado que possuem GABA e substância P, expressam principalmente receptores do tipo D1 e projetam-se diretamente para as porções motoras do globo pálido interno (GPi) e SNr. A via indireta (iMSN), surge de neurônios localizados no estriado que possuem ambos GABA e encefalina, expressam receptores do tipo D2 e projetam-se indiretamente para os núcleos de saída (GPi e SNr) através de conexões com o globo pálido externo (GPe) e NST (DELONG, 1990).

Os MSNs possuem enzimas que atuam na síntese e degradação dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc como a adenilato ciclase (AC), guanilato ciclase solúvel (GCs) e as fosfodiesterases (PDEs). A ativação destas enzimas é comprometida pela perda dos receptores dopaminérgicos que, conseqüentemente, altera os níveis de nucleotídeos cíclicos estriatais (THRELFELL; WEST, 2013).

O modelo clássico de funcionamento dos núcleos da base propõe que o controle motor depende do equilíbrio entre os dMSNs e iMSNs e que essas vias possuem mecanismos de funcionamento opostos, enquanto os dMSNs estão envolvidos na facilitação dos movimentos, os iMSNs funcionam inibindo movimentos indesejados. A ativação dopaminérgica dos receptores D1 dos dMSNs tem como consequência um aumento da excitabilidade, enquanto que a ativação de receptores do tipo D2 presentes nos iMSNs diminui a excitabilidade (ALBIN et al., 1989; DELONG, 1990).

Com a morte dos neurônios dopaminérgicos ocorrido na DP, ocorre um aumento da atividade dos neurônios da via iMSNs, resultando em uma excitação aumentada do GPi e SNr e uma diminuição na atividade dos neurônios da via dMSNs, levando a uma atividade inibitória do GPi e SNr para o tálamo e como consequência, ocorre a diminuição da atividade cortical (DELONG; WICHMANN, 2007). A terapia de reposição dopaminérgica utilizando a L-DOPA restaura a atividade entre as vias, no entanto, seu uso crônico causa uma hiperatividade nos dMSNs e hipoatividade nos iMSNs (ALBIN et al., 1989; DELONG, 1990).

As interações entre as entradas glutamatérgicas córtico-estriatais e os receptores dopaminérgicos possuem um papel fundamental na plasticidade sináptica estriatal (CALABRESI; CENTONZE; BERNARDI, 2000). A transmissão excitatória córtico-estriatal pode expressar duas formas opostas de plasticidade sináptica: a depressão de longo prazo (LTD), que consiste na redução da atividade das sinapses neuronais e a potenciação de longo prazo (LTP), onde ocorre um aumento da atividade das sinapses neuronais (PICCONI et al., 2003).

Essas formas de plasticidade podem representar os mecanismos celulares para a regulação de longo prazo exercida pelo corpo estriado sobre a atividade dos núcleos da base e para o armazenamento de habilidades motores (CALABRESI et al., 1996).

Os receptores dopaminérgicos D1 e D2 parecem modular as mudanças de longo prazo na plasticidade sináptica glutamatérgica em MSNs. A sinalização do receptor D1 promove a (LTP), enquanto a sinalização do receptor D2 promove a (LTD) (CALABRESI et al., 2007; GERDEMAN; ROSENI; LOVINGER, 2002). O tratamento a longo prazo com a L-DOPA aumenta a ativação dos receptores D1 dos dMSNs, desencadeando um processo de LTP sináptico como resultado da hiperativação desses receptores (PICCONI et al., 2003).

1.3. Modelo animal da DP induzido por 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

A 6-OHDA é um composto capaz de desencadear a degeneração de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos através do acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) como o superóxido, peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. As EROs levam a um desequilíbrio homeostático, pois interferem no processo respiratório mitocondrial causando danos celulares (BERNSTEIN et al., 2011; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

Os neurônios da via nigroestriatal são sensíveis à 6-OHDA, que possui alta afinidade com os transportadores de membrana. Dessa maneira, a 6-OHDA é comumente utilizada para induzir o modelo animal da DP. A 6-OHDA pode ser microinjetada no estriado, no feixe prosencefálico medial (FPM) ou diretamente na SNc através de cirurgia em aparelho estereotáxico (TIEU, 2011).

O tratamento de animais com lesão nigroestriatal induzida por 6-OHDA com L-DOPA permitiu, por exemplo, entender melhor os mecanismos fisiopatológicos relacionados com as LIDs e estudar possíveis formas de tratamento para estes efeitos colaterais (DUTY; JENNER, 2011).

As LIDs induzidas em modelos animais exibem o mesmo perfil das discinesias de pico de dose (tipo de discinesia mais comum). Assim, o modelo animal das LIDs representa uma forma efetiva de estudo farmacológico e comportamental, pois apresenta similaridades com as LIDs em humanos e respondem a tratamentos antidiscinéticos eficazes tanto em humanos, quanto em primatas não humanos (LUNDBLAD et al., 2002).

A 6-OHDA é transportada para dentro da célula pelos transportadores de dopamina (DAT) ou noradrenalina (NAT). Dentro dos neurônios, a 6-OHDA passa por um processo de degradação pela monoamina oxidase A (MAO-A), produzindo como resultado as espécies reativas de oxigênio (EROs) que são capazes de danificar diversas proteínas celulares. Além disso, a 6-OHDA prejudica a atividade do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Em modelos animais experimentais, a 6-OHDA é geralmente administrada em associação com bloqueadores de transportadores de noradrenalina (NAT), como a desipramina (DMI), para preservar as fibras noradrenérgicas e aumentar a seletividade da degeneração dos neurônios dopaminérgicos (SIMOLA, MORELLI e CARTA, 2007).

1.4. Sistema nitrérgico.

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa de alta difusibilidade que está envolvida no funcionamento de diversos mecanismos biológicos. Pode atuar na vasodilatação do endotélio vascular, em reações do sistema imunológico a agentes patogênicos ou ainda atuar como neuromodulador no cérebro (MONCADA; HIGGS, 1993). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina por três diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), que é produzida nos tecidos endoteliais e atua principalmente no relaxamento dos vasos sanguíneos; a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que está envolvida em

ações do sistema imunológico; e a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), que atua como um neurotransmissor atípico (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

O NO difunde-se livremente através das membranas celulares, essa característica permite a interação com células adjacentes sem a necessidade de receptores de membrana. Nos MSNs estriatais, após a ativação de neurônios pós sinápticos, ocorre a liberação de glutamato pelos terminais pré sinápticos que se liga aos receptores N-metil D-Aspartato (NMDA) presentes na superfície de terminais pós sinápticos, promovendo a entrada de Ca^{2+} e ativação da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) através de um mecanismo dependente de cálcio/calmodulina. O NO pode atuar como um neurotransmissor retrógrado, ou seja, o estímulo ocorre no sentido pós-sináptico para o pré-sináptico. O NO é sintetizado pela enzima nNOS utilizando L-arginina como substrato e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato (NADPH), liberando L-citrulina e NO (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

No estriado, o NO é produzido pelos interneurônios que expressam a enzima nNOS e é posteriormente difundido para os MSNs. Uma vez no citosol dos MSNs, ocorre então a ligação do NO com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) iniciando a reação de síntese do GMPc a partir de trifosfato de guanosina (GTP) (GIOVINAZZO; DAWSON; DAWSON, 2014).

A sinalização realizada pelo NO pode atuar mediando e/ou regulando múltiplos aspectos da neurotransmissão estriatal (WEST; GRACE, 2000). O papel do NO na neuromodulação estriatal foi relatado inicialmente em um estudo que demonstrou que o doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) quando convertido em NO interage com a enzima GCs em terminais da via nigroestriatal promovendo a fosforilação da proteína quinase G (PKG), e ativando enzimas PDEs (TSOU et al., 1993; GHIGLIERI et al., 2012).

As enzimas PDEs são divididas em 11 famílias, cada uma com funções distintas e que podem hidrolisar os nucleotídeos cíclicos. No estriado, as enzimas PDEs dos tipos 1B, 2A e 10A são amplamente distribuídas, sendo responsáveis pela hidrólise de ambos AMPc e GMPc. As PDEs com ações específicas para AMPc (3A, 3B, 4D, 7B e 8B) também são amplamente expressas no estriado. A PDE9A possui substrato específico para GMPc e é expressa de forma moderada no estriado (BENDER; BEAVO, 2006).

A depleção dopaminérgica estriatal resulta em alterações transitórias e dinâmicas na síntese (NOS dependente de sGC) e degradação (dependente de PDE)

dos nucleotídeos cíclicos estriatais. A via de sinalização do NO atua também nos mecanismos que levam ao surgimento das LIDs (CALABRESI et al., 2013).

Altos níveis de NO presentes na SNc parkinsoniana indicam a importância que o sistema nitrérgico pode ter no estabelecimento do ciclo de inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial e na formação de radicais livres contribuindo para a morte dos neurônios dopaminérgicos durante a PD (SHERGILL et al., 1996).

Em modelos animais da DP com 6-OHDA foi demonstrado que o uso do inibidor da enzima nNOS 7-Ni e do doador de NO NPS foram capazes de diminuir as incidências das LIDs sem afetar a capacidade terapêutica da L-DOPA (BORTOLANZA et al., 2016; SOLÍS et al., 2015; PADOVAN-NETO et al., 2009). Além disso, resultados utilizando animais knockout para a enzima nNOS evidenciaram que a via de sinalização do NO é necessária para a excitabilidade dos MSNs em resposta a transmissão glutamatérgica no estriado (PADOVAN-NETO et al., 2015ab).

Em modelos animais da DP, o uso de inibidores de enzimas nNOS e de doadores de NO apresentaram efeitos antidiscinéticos e foram capazes de diminuir as LIDs (BORTOLANZA et al., 2016; SOLIS et al., 2015).

A relação do NO com a morte neuronal dopaminérgica foi demonstrada em modelo animal com 6-OHDA através da administração do inibidor da nNOS NG-nitro-L-arginine (L-NOARG). Os resultados mostraram uma redução significativa nos danos dopaminérgicos induzidos por 6-OHDA através de imuno-histoquímica para tirosina hidroxilase (TH), sugerindo que a inibição da síntese de NO pode diminuir os efeitos tóxicos da 6-OHDA nos terminais dopaminérgicos e em corpos celulares de dopamina em sub-regiões do SN no cérebro de ratos (GOMES; RAISMAN-VOZARI; DEL-BEL, 2008),

O Nitroprussiato de sódio (NPS) é um doador de NO utilizado na clínica para diminuir a pressão arterial em pacientes hipertensivos. Sua eficácia no controle de hipertensão arterial quando administrado intravenosamente foi demonstrada em um estudo realizado por Page et al. (1955). É sugerido também que a administração de NPS é capaz de melhorar os sintomas psicóticos de pacientes com esquizofrenia, no entanto, os mecanismos pelo quais o NPS atua na esquizofrenia não são completamente compreendidos (HALLAK et al., 2013).

O NO liberado pela administração de NPS parece agir através da vasodilatação aumentando a perfusão cerebral para regiões com fluxo sanguíneo diminuído em pacientes com esquizofrenia, talvez exercendo um efeito antipsicótico

(BROWN et al., 2019; PINKHAM et al., 2011). Nas células vasculares, o NPS atua reagindo com grupos sulfidrila em eritrócitos, albumina e outras proteínas. A rápida degradação do NPS libera o NO, que funciona como um potente vasodilatador, e cianeto que, quando acumulado, pode desencadear efeitos tóxicos (IVANKOVICH et al., 1978; HOTTINGER et al., 2014; RINDONE; SLOANE, 1992).

No estriado, o NPS estimula a liberação de L-DOPA de uma forma dependente da sua concentração e do tempo por um mecanismo independente de Ca^{2+} . Um estudo demonstrou que a infusão intraestriatal de NPS em ratos através de microdiálise aumentou muito a concentração de dopamina e diminuiu a concentração de L-DOPA. Além disso, é sugerido que a ação do NO na liberação de L-DOPA é mediada por GMPc e também pelo mecanismo de formação de peroxinitrito (SANCHEZ; ABREU; GONZALEZ, 2002).

Nossa hipótese de trabalho é que o uso de inibidores e doadores de NO são capazes de reduzir a atividade exagerada da via córtico-estriatal e dessa maneira equilibrar a atividade das vias de saída do estriado atenuando as LIDs.

2. OBJETIVOS

- 2.1. **Objetivo geral:** Determinar o papel do NPS nas LIDs e na modulação da excitabilidade dos MSNs estriatais durante a ocorrência das LIDs.
- 2.2. **Objetivo específico 1:** caracterizar a atividade antidiscinética do NPS em animais parkinsonianos discinéticos.
- 2.3. **Objetivo específico 2:** caracterizar a atividade evocada por estimulação cortical dos MSNs estriatais.

3. METODOLOGIA

3.1. Aspectos Éticos

A realização do projeto foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais de Experimentação (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (número do processo 18.5.35.59.5).

3.2. Teste de Caminhada

O teste de caminhada é um teste de comportamento motor utilizado com o objetivo de avaliar os déficits motores consequentes da lesão unilateral com 6-OHDA e, posteriormente, os efeitos antiparkinsonianos do tratamento com a L-DOPA (OLSSON et al., 1995). Para o teste, cada animal foi segurado com uma mão fixando um dos membros anteriores em uma superfície plana e levantando a parte posterior acima da superfície. Com a outra mão, uma das patas foi imobilizada para que não tocasse a bancada. Posteriormente, o rato foi movimentado lateralmente por uma distância de 90 centímetros em 4 segundos e o número de passos efetuados pelo animal foram anotados. O mesmo procedimento foi realizado com a outra pata do animal.

Os animais selecionados foram aqueles com 5 passos ou menos realizados com a pata contralateral a lesão (esquerda) em relação ao lado ipsilateral (controle) (OLSSON et al., 1995).

3.3. Cirurgia de indução do Parkinson experimental pela 6-OHDA.

Foram utilizados para estes experimentos ratos machos da linhagem Sprague- Dawley (~250 g). Os animais foram anestesiados com cetamina (70 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e receberam, através de cirurgia estereotáxica, uma microinjeção de 4 µl (2.5 µg/µl na velocidade de 0,5 µl/min) de 6-hidroxidopamina (6-OHDA; total de 10 µg) no feixe prosencefálico medial (FPM) direito (AP: -4,3 mm, ML: +1,6 mm e

DV: -8,3mm, a partir do Bregma) (PAXINOS; WATSON, 2007; PADOVAN-NETO et al., 2015a).

A eficácia da lesão unilateral na via nigroestriatal foi avaliada 4 semanas após a cirurgia com a utilização do teste de caminhada (OLSSON et al., 1995).

3.4. Grupos de Tratamento e desenho experimental

O tratamento crônico dos animais começou 4 semanas após a microinjeção de 6-OHDA no FPM. Durante as 3 semanas de tratamento, as drogas foram administradas de segunda a sexta-feira e o teste de caminhada foi realizado 1 vez por semana (terças-feiras) para avaliar os efeitos terapêuticos da L-DOPA. Nas quartas, quintas e sextas-feiras, os animais foram colocados em cilindros transparentes e filmados durante 180 minutos após a administração da L-DOPA para as análises das LIDs.

3.4.1. Tratamento com os compostos ODQ e 7-NI

Para determinar qual o papel do NO nas LIDs realizamos experimentos preliminares com inibidores da via de sinalização do sistema nitrérgico e avaliamos seu impacto nas LIDs. Os inibidores utilizados foram ODQ (inibidor seletivo da GCs) e 7-nitroindazole (7-NI; inibidor preferencial da nNOS). Um grupo de 7 animais foi tratado cronicamente com L-DOPA (2,5 ou 5 mg/kg L-DOPA combinada com 12,5 mg/kg de benserazida) ao longo de três semanas.

Após o estabelecimento das discinesias, os animais receberam as combinações de tratamentos descritos na Tabela 1. Cada combinação de drogas foi administrada durante 5 dias (segunda a sexta-feira), em duas semanas consecutivas (denominadas “semana 1” e “semana 2”).

Tabela 1 - Tratamento dos grupos em cada fase do experimento

Tratamentos (semana 1)	Tratamentos (semana 2)
Veículo + L-DOPA 5 mg/kg (n=3) Veículo + L-DOPA 5 mg/kg (n=4)	Veículo + L-DOPA 5 mg/kg (n=3) 7-NI 30 mg/kg + L-DOPA 5 mg/kg (n=4)
Veículo + L-DOPA 5 mg/kg (n=3) Veículo + L-DOPA 5 mg/kg (n=4)	Veículo + L-DOPA 5 mg/kg (n=3) ODQ 5 mg/kg + L-DOPA 5 mg/kg (n=4)
Veículo + L-DOPA 2,5 mg/kg (n=3) Veículo + L-DOPA 2,5 mg/kg (n=3)	Veículo + L-DOPA 2,5 mg/kg (n=4) ODQ 5 mg/kg + L-DOPA 2,5 mg/kg (n=3)

Veículo consiste em DMSO (5%), salina 0,9% (50%) e polietilenoglicol 300

(45%) - (i.p) ODQ- (5mg/kg) diluída no Veículo – 1 ml/kg (i.p)

7-NI- (30mg/kg) diluída no Veículo – 2 ml/kg (i.p)

L-DOPA – 5 mg/kg (combinada com 12,5 mg/kg de benserazida) diluída em salina 0,9% (s.c)

3.4.2. Tratamento com Nitroprussiato de Sódio (2 mg/kg)

Utilizamos o doador de NO (NPS) para contrastar com os efeitos observados com os fármacos inibidores da atividade das enzimas nNOS e GCs. Os grupos experimentais utilizados nesse experimento estão indicados na Tabela 2.

Tabela 2 - Tratamento dos grupos em cada fase do experimento

Lesão	Tratamentos (semana 1)	Tratamentos (semanas 2 e 3)
Sham (n=9)	Veículo + Veículo	Veículo + Veículo
6-OHDA (n=12)	Veículo + L-DOPA	Veículo + L-DOPA
6-OHDA (n=8)	Veículo + L-DOPA	NPS + L-DOPA

Veículo - solução salina 0,9% - 1 ml/kg (s.c)

Nitroprussiato de Sódio (2 mg/kg) diluída no veículo (salina 0,9% – 1ml/kg i.p)

L-DOPA – 5 mg/kg (combinada com 12,5 mg/kg de benserazida) diluída em salina 0,9% (s.c)

3.5. Análise das discinesias induzidas pela L-DOPA (LIDs)

Os ratos foram colocados individualmente em cilindros plásticos transparentes e filmados durante 180 minutos. Posteriormente, as LIDs foram analisadas a cada 30 minutos até 180 minutos após a aplicação da L-DOPA. Para a avaliação das LIDs, foi utilizado um sistema de escores que avaliam o tempo de incidência e a amplitude das discinesias (CENCI et al., 1998; WINKLER et al., 2002).

Foram analisados quatro tipos de LIDs contralaterais à lesão, que são divididas de acordo com sua distribuição anatômica: (i) distonia axial: torção lateral ou da cabeça, pescoço e tronco para o lado contralateral à lesão; (ii) discinesia do membro anterior: movimentos de flexão-extensão, abdução-adução ou circundução do membro anterior; inclui a abertura/fechamento dos dígitos e pronação ou supinação do punho; (iii) discinesia orofacial: movimentos da mandíbula, protrusão da língua, podendo ser acompanhados por mordidas injuriosas na pele ou no membro anterior.

Os escores referentes ao tempo de incidência em que os movimentos ocorrem durante 1 minuto observado foram categorizados em uma escala de 0 a 4, em que 0 - ausência de discinesias, 1 - movimentos involuntários ocasionais presentes durante menos do que 50% do tempo de observação, 2 - movimentos involuntários presentes durante mais do que 50% do tempo de observação, 3 - movimentos repetitivos ou contínuos interrompidos por uma distração sensorial, 4 - movimentos repetitivos ou compulsivos não interrompidos por estímulo sensorial.

Foram atribuídos escores de acordo com a amplitude das discinesias axial, do membro anterior e orofacial (WINKLER et al., 2002). A amplitude das discinesias axiais foram avaliadas com escores de 0 a 4, sendo que: 0 - ausente; 1 - torção lateral da cabeça e pescoço em um ângulo de aproximadamente 30°; 2 - torção lateral da cabeça e pescoço em um ângulo que varia entre 30° e 60°; 3 - torção lateral da cabeça, pescoço e da parte superior do tronco com angulação de 60° a 90°; 4 - torção lateral da cabeça, pescoço e da parte superior do tronco em uma angulação superior a 90° fazendo com que o animal perca o equilíbrio.

Para as discinesias do membro anterior, utilizamos os seguintes escores: 0 - ausente; 1 - movimentos brandos que acometem a parte distal (mão) do membro anterior; 2 - movimentos de baixa amplitude, mas que causam translocação visível da parte distal e proximal do membro (mão e braço); 3 - translocação total de todo o

membro com contração visível da musculatura do ombro (mão, braço e ombro); 4 - movimentos vigorosos de todo o membro (amplitude exagerada; rotação do membro anterior). A amplitude das discinesias orofaciais foi avaliada de acordo com a protusão ou não da língua, sendo que: 0 - ausente; 1-movimentos orofaciais sem protrusão da língua; 2-movimentos orofaciais com protrusão da língua.

Os escores de cada tipo de discinesia em relação ao tempo de incidência e a amplitude então foram multiplicados em cada período observado para avaliar de forma geral as discinesias nos animais durante os tratamentos em cada semana (PADOVAN-NETO et al., 2015a).

3.6. Eletrofisiologia

Para estudar o padrão de disparo dos MSNs em animais parkinsonianos tratados com L-DOPA, realizamos registros eletrofisiológicos in vivo em animais anestesiados com a finalidade de preservar os circuitos envolvidos na neurotransmissão córtico-estriatal. Foram realizados registros extracelulares de atividade evocada por estimulação cortical nos MSNs estriatais (PADOVAN- NETO et al., 2015). Eletrodos bipolares foram implantados no córtex motor primário (AP: -3,0 mm, ML: -2,5 mm e DV: -1,5 mm, a partir do bregma e na SNr (AP: +5,0 mm, ML: -2,5 mm e DV: -8,0 mm, a partir do bregma) (PAXINOS; WATSON, 1998) ipsilaterais ao estriado parkinsoniano.

A atividade evocada por estimulação cortical foi registrada em múltiplos MSNs estriatais de 30 a 180 minutos após a administração da L-DOPA utilizando capilares de vidro (2.0 mm) de diâmetro preenchidos com solução NaCl 2M que foram introduzidos no estriado (AP: -0,75 mm, ML: -3,5 mm, DV: 2,5 mm) com micromanipulador acoplado ao aparelho estereotáxico (PAXINOS; WATSON, 2007) (PADOVAN-NETO et al., 2015a).

Os neurônios que responderam aos estímulos corticais com latência curta (5-15 ms) após estimulação foram registrados com diferentes intensidades (1000, 800, 600 e 400uA) durante 50 estímulos corticais. Em seguida, foi registrada a atividade espontânea dos neurônios (sem estimulação cortical) por um período de 3 minutos. A probabilidade de disparo por estimulação do córtex motor foi posteriormente avaliada.

Utilizamos um protocolo de estimulação antidrômica (THRELFELL et al., 2009), para tentar identificar os dMNS.

Os MSNs foram identificados pelo seu padrão irregular e pela duração do seu potencial de ação (>1,0 ms), os interneurônios de disparo rápido (FSI) foram identificados pelo seu padrão de disparos rápidos, resposta de curta latência à estimulação cortical e o potencial de ação de curta duração (<0,95 ms).

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).

3.7. Perfusão

Ao término dos experimentos, os animais já anestesiados foram perfundidos transcardialmente com 150 ml de solução ACSF fria. O encéfalo dos animais foi rapidamente removidos e pós-fixados em solução de tampão fosfato (PB) 0,1M contendo paraformaldeído (PFA) a 4% por 90 minutos, posteriormente foram preservados em sacarose 30% e congelados. Os neurônios dopaminérgicos da SNc serão visualizados por meio de imunocitoquímica (free floating) para a enzima tirosina hidroxilase (protocolo detalhado em PADOVAN-NETO et al., 2015).

3.8. Análise estatística

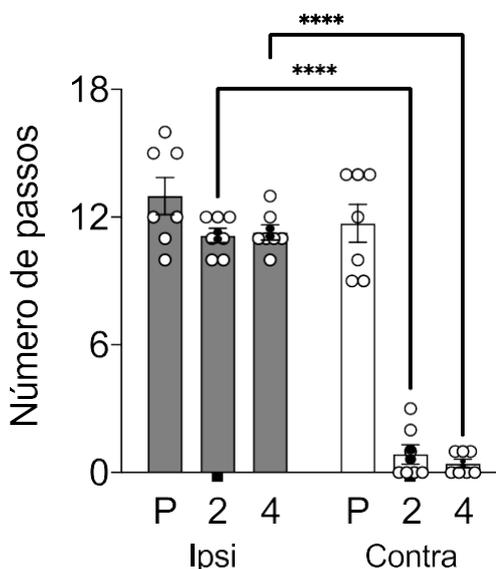
O teste de caminhada, a atribuição de escores para as LIDs e os dados adquiridos com os registros eletrofisiológicos foram avaliados de acordo com critérios já estabelecidos (PADOVAN-NETO et al., 2015). A significância estatística do efeito de drogas em parâmetros eletrofisiológicos (atividade evocada por estimulação cortical) ou comportamentais (teste de caminhada ou discinesias) foram determinadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias e pelo teste de Mann-Whitney conforme indicado. Testes de post-hoc (Holm-Sidak) foram realizados para identificar os grupos que contribuíram com as diferenças observadas nas ANOVAs. O nível de significância adotado foi $P < 0,05$, GraphPad Prism 7.04.

4. RESULTADOS

4.1. Efeitos do 7-NI e ODQ nas discinesias induzidas pela L-DOPA

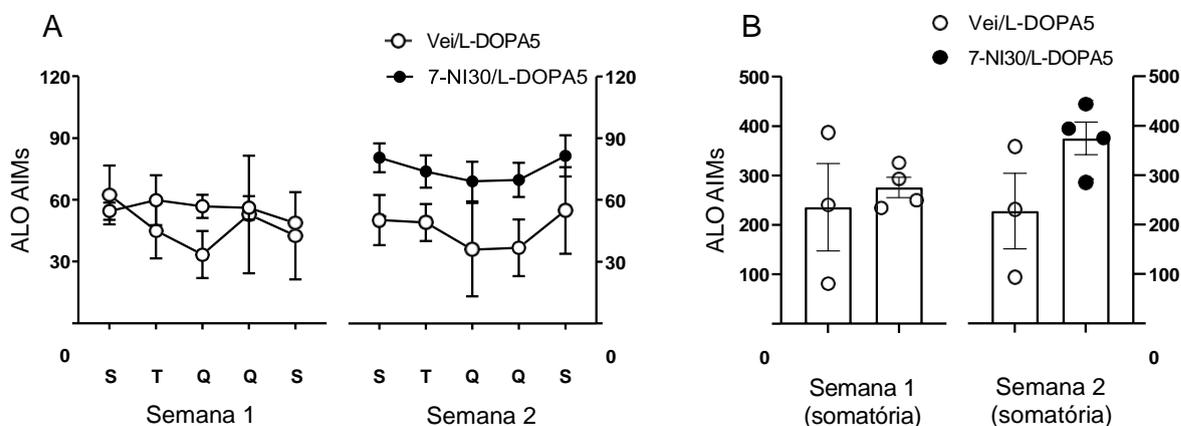
O teste de caminhada foi utilizado para monitorar a acinesia dos membros anteriores dos ratos e foi realizado antes, na segunda e na quarta semana após a lesão unilateral com 6-OHDA. Os dados obtidos com o teste de caminhada evidenciaram um efeito no fator tempo ($F(2, 24) = 125.0, P < 0,0001$) e no fator lado (ipsilateral e contralateral) ($F(1, 12) = 143.0, P < 0,0001$) com interação entre os dois fatores ($F(2, 24) = 65.35, P < 0,0001$). O teste post-hoc mostrou que a lesão unilateral no feixe prosencefálico medial direito dos animais induziu uma redução significativa no número de passos efetuados pelos animais com a pata contralateral a lesão duas e quatro semanas após a cirurgia ($P < 0,0001$ vs. lado ipsilateral; Figura 1). Não houve alteração no número de passos efetuados pelos animais com a pata ipsilateral ($P > 0,05$; Figura 1).

Figura 1. Teste de caminhada que avalia a acinesia nos animais antes, duas e quatro semanas depois da administração unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. O lado contralateral a lesão apresentou diminuição significativa após a lesão com 6-OHDA (**** $P < 0,0001$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas, post-hoc de Holm-Sidak) quando comparado ao lado ipsilateral a lesão, que não apresentou diminuição nos passos executados. Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 7 animais do grupo 6-OHDA.



Os animais selecionados no teste de caminhada foram tratados cronicamente com L-DOPA (5 mg/kg combinada com benserazida 12,5 mg/kg) ao longo de 3 semanas. Inicialmente investigamos o efeito do 7-NI (inibidor da nNOS) nas LIDs. A Figura 2 mostra a soma das LIDs (axial, do membro anterior e orolingual) em cada dia da semana de tratamento. A Figura 2-A (esquerda) mostra que não houve efeito do tratamento com veículo e L-DOPA 5 mg/kg entre os subgrupos de animais discinéticos (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). A administração de 7-NI 30 mg/kg 30 minutos antes da L-DOPA (Figura 2-A, direita) não alterou com os escores das discinesias quando comparado com o grupo tratado com veículo e L-DOPA 5 mg/kg (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). O 7-NI (30 mg/kg) não alterou a somatória dos escores das LIDs (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$; Figura 2-B).

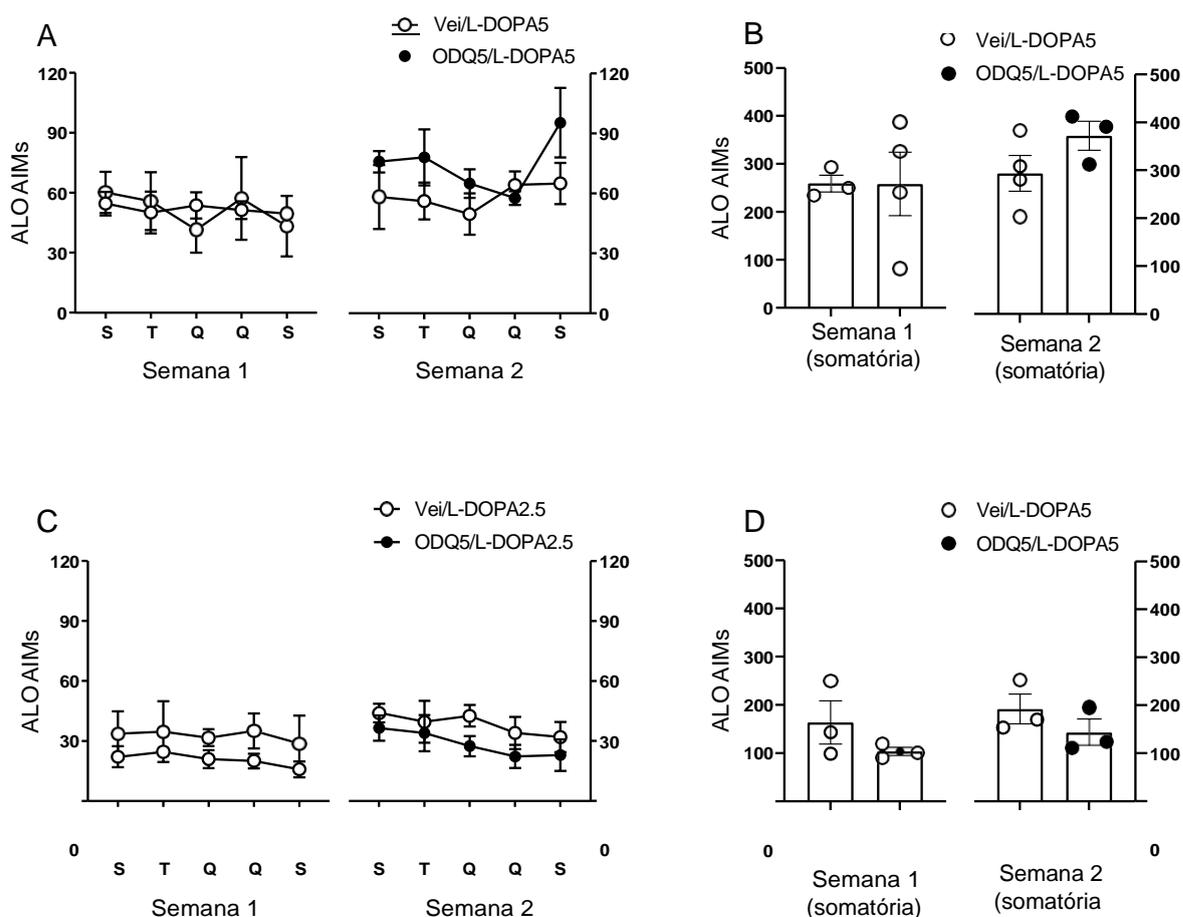
Figura 2. Análise dos movimentos involuntários anormais induzidos pelo tratamento crônico com 7-NI (30 mg/kg) e L-DOPA (5 mg/kg). (A) Os gráficos mostram as somas das discinesias de cada dia ao longo de 5 dias de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). (B) Não houve diferença na somatória dos escores das LIDs ao longo das duas semanas de tratamento (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média ($n = 3$ a 4 animais/grupo).



O potencial antidiscinético do ODQ (inibidor da enzima GCs) também foi testado em animais tratados com L-DOPA 2,5 e 5 mg/kg. A Figura 3 apresenta a soma das LIDs (axial, do membro anterior e orolingual) em cada dia da semana de tratamento. As Figuras 3-A e C mostram que não houve efeito do tratamento com veículo e L-DOPA 5 mg/kg (Figura 3-A, esquerda) ou veículo e L-DOPA 2,5 mg/kg (Figura 3-C, esquerda) entre os subgrupos de animais discinéticos (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$).

A administração de ODQ 5 mg/kg 30 minutos antes da L-DOPA (Figura 3-A e C) não alterou os escores das discinesias quando comparado com o grupo tratado com veículo e L-DOPA 5 mg/kg (Figura 3-A, direita) ou veículo e L-DOPA 2,5 mg/kg (Figura 3-C, direita) (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). O ODQ (5 mg/kg) não alterou a somatória dos escores das LIDs em animais tratados com L-DOPA 5 mg/kg (Figura 3-B) ou L-DOPA 2,5 mg/kg (Figura 3-D) (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$).

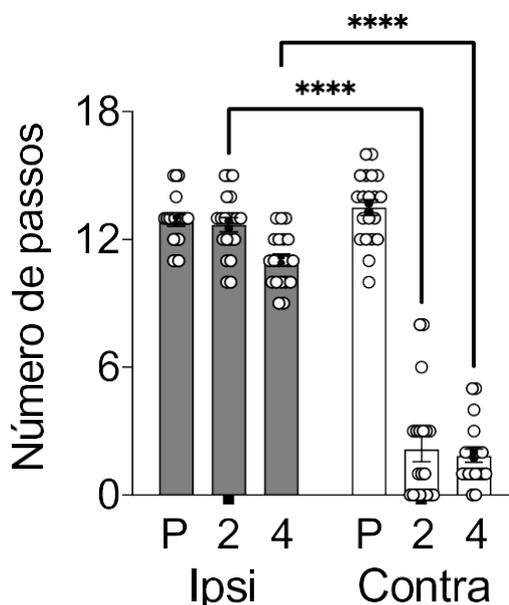
Figura 3. Análise dos movimentos involuntários anormais induzidos pelo tratamento crônico com ODQ (5 mg/kg) e L-DOPA (5 e 2,5 mg/kg). (A-C) Os gráficos mostram as somas das discinesias (axial, membro anterior e orofacial) em cada dia da semana, ao longo de 5 dias de tratamento. Não houve diferenças significativas entre os tratamentos com veículo e L-DOPA com as doses de 5 mg/kg (A) e 2,5 mg/kg (C). O tratamento dos animais discinéticos com ODQ (5 mg/kg) não atenuou as discinesias quando comparado com o grupo tratado com veículo e L-DOPA 5 mg/kg (Figura 3-A, direita) ou veículo e L-DOPA 2,5 mg/kg (Figura 3-C, direita) (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). (B-D) Os gráficos apresentam a somatória dos dias em cada semana. O tratamento com ODQ (5 mg/kg) não alterou a somatória dos escores das LIDs em animais tratados com as doses de 5 mg/kg (B) e 2,5 mg/kg (C). (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$). Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média ($n = 3$ a 4 animais/grupo).



4.2. Efeitos do NPS nas discinesias induzidas pela L-DOPA

O teste de caminhada foi realizado no grupo de animais que posteriormente foram tratados com NPS. Os ratos que obtiveram menos do que 5 passos com a pata contralateral a lesão foram classificados como parkinsonianos (grupo 6-OHDA). De acordo com a análise dos dados (Figura 4) foi evidenciado um efeito no fator tempo ($F(2, 76) = 228,4$; $P < 0,0001$) e no fator lado (ipsilateral e contralateral) ($F(1, 38) = 332,2$; $P < 0,0001$). Observamos também uma interação entre estes fatores ($F(2, 76) = 158,8$; $P < 0,0001$). Os teste post-hoc mostraram uma diminuição significativa no número de passos efetuados com a pata contralateral a lesão nas semanas 2 e 4 após a cirurgia ($P < 0,0001$).

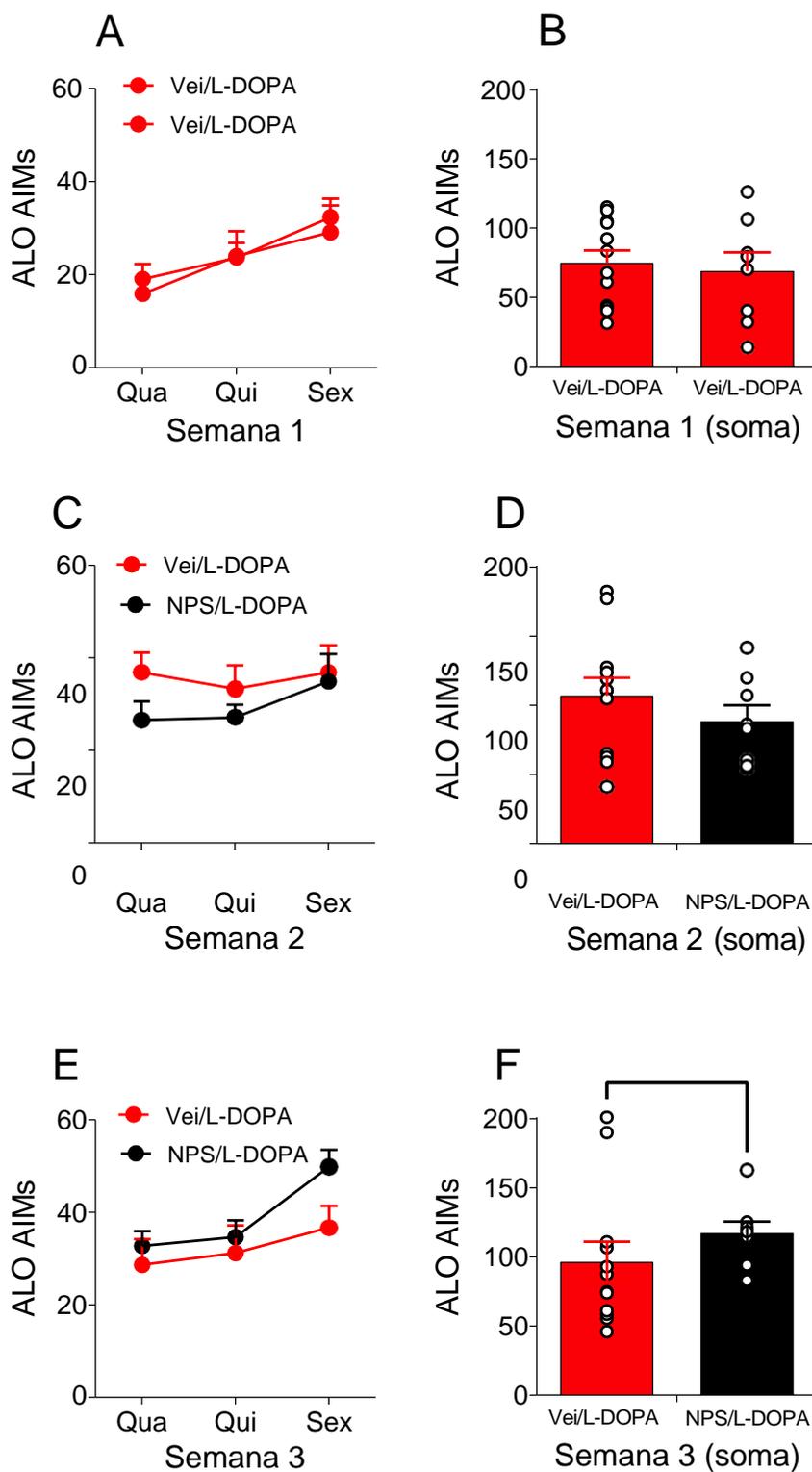
Figura 4. Teste de caminhada que avalia a acinesia nos animais antes, duas e quatro semanas depois da administração unilateral de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial. Os animais lesionados com 6-OHDA mostraram uma diminuição significativa no número de passos realizados com a pata contralateral a lesão (**** $P < 0,0001$, ANOVA de duas vias de medidas repetidas, post-hoc de Holm-Sidak). Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 20 animais do grupo 6-OHDA.



A Figura 5 apresenta as LIDs (axial, do membro anterior e orolingual) em todas as semanas de tratamento. Os escores das discinesias são apresentados de maneira individual para cada dia (quarta, quinta e sexta-feira) das semanas 1, 2 e 3 de tratamento crônico (Figuras 5-A, C e E). A somatória total em cada semana também é apresentada (Figuras 5-B, D e F).

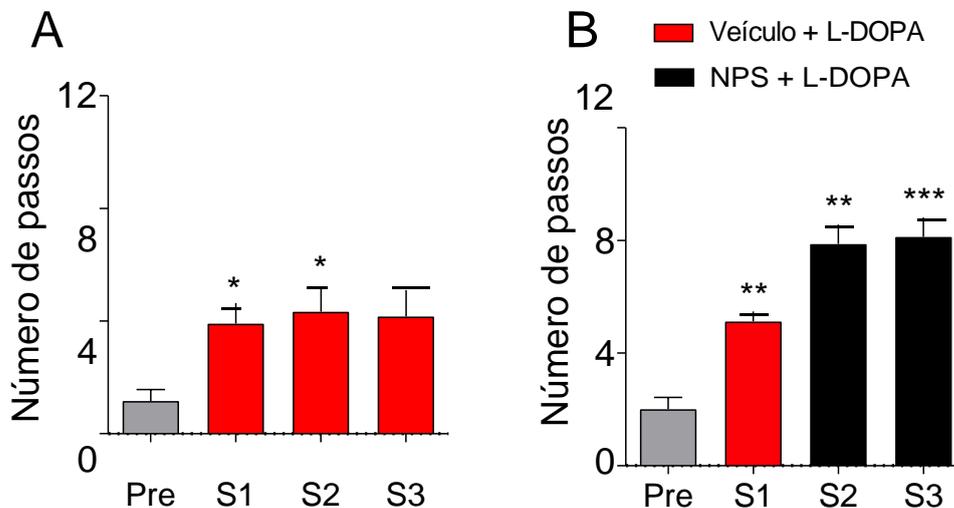
As análises mostraram que não houve diferença entre a intensidade das discinesias durante a primeira semana de tratamento com L-DOPA (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$; Figuras A e B). A administração de NPS não alterou a incidência das LIDs na segunda semana de tratamento (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$; Figuras C e D). Entretanto, o NPS aumentou a incidência das LIDs na terceira semana de tratamento (Mann-Whitney U test; $P < 0,05$; Figuras E e F). Esses resultados sugerem que o uso crônico de NPS pode potencializar as LIDs.

Figura 5. Análise dos movimentos involuntários anormais induzidos pelo tratamento crônico com L-DOPA e Nitroprussiato de Sódio (NPS). (A-C-E) Os gráficos apresentam os escores das discinesias de forma individual para cada dia das semanas 1, 2 e 3 do tratamento e (B-D-F) com a somatória total em cada semana. Não houve diferença entre a intensidade das discinesias durante a primeira semana de tratamento com L-DOPA (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$; A-B). O tratamento com NPS nos animais discinéticos não alterou as LIDs durante a segunda semana de tratamento (Mann-Whitney U test; $P > 0,05$; C-D). Entretanto, aumentou a incidência das LIDs durante a terceira semana de tratamento (Mann-Whitney U test; $P < 0,05$; E-F). Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média ($n = 8$ a 12 animais/grupo).



Durante as semanas de tratamento, foram realizados testes de caminhada para avaliar a atividade antiparkinsoniana da L-DOPA. A administração de Veículo e L-DOPA (Figura 6-A) aumentou o número de passos realizados com a pata contralateral a lesão quando comparado o pré tratamento ($P < 0,05$). Esses resultados sugerem que o uso crônico da L-DOPA melhorou o déficit motor na pata contralateral a lesão. As análises dos animais tratados com NPS e L-DOPA evidenciam um aumento significativo no número de passos contralaterais a lesão com o passar das semanas quando comparado o pré tratamento ($P < 0,05$). Esses resultados sugerem que o NPS não interferiu com a atividade antiparkinsoniana da L-DOPA.

Figura 6. Teste de caminhada que avalia a acinesia nos animais durante o tratamento crônico. (A) Animais tratados com veículo + L-DOPA mostraram aumento significativo no número de passos realizados com a pata contralateral a lesão quando comparado o pré-tratamento com a semana 1 ($P < 0,05$) e semana 2 ($P < 0,05$). (B) Animais tratados com NPS + L-DOPA mostraram aumento significativo no número de passos realizados com a pata contralateral a lesão quando comparado o pré-tratamento com a semana 1 ($P < 0,01$), semana 2 ($P < 0,01$) e semana 3 ($P < 0,001$; Anova de uma via, post-hoc de Holm-Sidak). Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média. Resultados são baseados em 12 animais Veículo/ L-DOPA e 8 animais NPS/ L-DOPA.



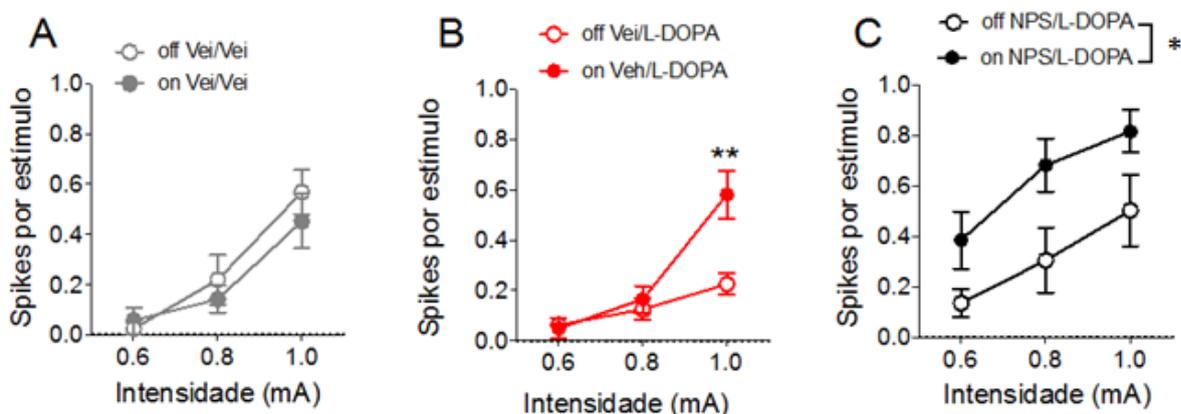
4.3. Eletrofisiologia

A eletrofisiologia foi realizada nos animais na 4ª semana de tratamento. Avaliamos os efeitos dos diferentes tratamentos na excitabilidade dos MSNs estriatais mediante estimulação do córtex motor. Os registros foram realizados antes (“off”) e após (“on”) os tratamentos.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os registros realizados no grupo Sham ($P > 0,05$; Figura 7-A). As análises evidenciaram uma interação entre a intensidade de corrente e tratamento no grupo de animais tratados cronicamente com Veículo e L-DOPA ($F(2, 34) = 5,89$; $P < 0,01$; Figura 7-B). A análise post hoc mostrou que os animais discinéticos apresentaram maior probabilidade de disparo evocado por estimulação cortical após a administração da L-DOPA ($P < 0,01$; intensidade de 1 mA).

As análises também mostraram um efeito geral do tratamento com NPS e L-DOPA ($F(1, 18) = 4,89$; $P < 0,05$) mas não houve interação entre a intensidade de corrente e tratamento ($F(2, 36) = 0,63$; $P < 0,05$; Figura 7-C). Esses resultados sugerem que parece haver uma facilitação da atividade córtico-estriatal nos animais tratados com NPS/L-DOPA.

Figura 7. Análise dos efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na atividade dos MSNs. Os gráficos apresentam os disparos por estímulo em diferentes intensidades antes e após a administração de drogas nos animais. A- Não houve diferenças significativas entre os registros realizados no grupo Sham ($P > 0,05$; Anova de duas vias, post-hoc de Holm-Sidak). B- Houve uma interação entre a intensidade de corrente e tratamento no grupo de animais tratados cronicamente com Veículo e L-DOPA ($P < 0,05$; Anova de duas vias, post-hoc de Holm-Sidak). C- As análises mostraram um efeito geral do tratamento com NPS e L-DOPA ($P < 0,05$) mas não houve interação entre a intensidade de corrente e tratamento ($P < 0,05$). A análise post hoc mostrou que os animais discinéticos apresentaram maior probabilidade de disparo evocado por estimulação cortical após a administração da L-DOPA com intensidade de 1 mA ($P < 0,01$; Anova de duas vias, post-hoc de Holm-Sidak). Dados expressos com as médias \pm erro padrão da média (Sham $n=9$ animais, 14 células; L-DOPA $n=7$ animais, 19 células; NPS $n=7$ animais, 20 células).



5. DISCUSSÃO

As análises comportamentais das LIDs em ratos parkinsonianos tratados com os compostos ODQ e 7-NI (que inibem as enzimas GCs e nNOS, respectivamente) não apresentaram efeitos sobre as discinesias mesmo em diferentes doses de L-DOPA. A utilização do doador NPS (2 mg/kg) aumentou a incidência das discinesias quando comparado aos animais controle.

As análises eletrofisiológicas sugerem que a lesão dopaminérgica induzida pela 6-OHDA promove a facilitação na atividade da via córtico-estriatal (evidenciada pela diminuição da latência de disparo e aumento da probabilidade de disparos evocados por estimulação cortical).

Observamos ainda uma facilitação na atividade da via córtico-estriatal nos animais tratados com NPS e L-DOPA quando comparados aos controles. Nossos resultados sugerem que o aumento da sinalização da via do NO podem gerar uma hiperatividade nos MSNs e conseqüentemente o aumento das LIDs.

5.1. Efeitos do tratamento com ODQ e 7-NI na modulação das LIDs.

Os dados adquiridos até o momento sugerem que o uso dos inibidores ODQ e 7-NI não tiveram efeitos na modulação das LIDs nas condições experimentais utilizadas neste trabalho. É importante destacar que estudos anteriores mostram a eficácia do uso de inibidores da via de sinalização nNOS-NO-GCs-GMPc. A aplicação do inibidor seletivo da GCs ODQ (100 mM) através da microinjeção intracérebro ventricular (i.c.v) de ratos discinéticos tratados cronicamente com L-DOPA (10 mg/kg) por meio de gavagem (oral), demonstrou redução significativa das LIDs (BARIOTTO-DOS-SANTOS et al, 2019).

As influências do sistema nitrérgico na modulação das LIDs foi demonstrada com a utilização do inibidor da enzima nNOS 7-NI em ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA. O 7-NI (1-30 mg/kg) foi capaz de atenuar as discinesias geradas pela administração crônica de L-DOPA (30 mg/kg, oral) (PADOVAN-NETO et al., 2009; PADOVAN-NETO et al., 2015a). Outro estudo também demonstrou o efeito

antidiscinético do 7-NI (10 mg/kg i.p) em ratos tratados cronicamente com L-DOPA (10 mg/ kg) por via oral (TAKUMA et al., 2012).

O potencial antidiscinético do 7-NI (30 mg/kg i.p) também foi evidenciado em camundongos deficientes para o fator de transcrição Pitx3 tratados com L-DOPA (10 mg/kg i.p) (SOLÍS et al., 2015).

De maneira geral, os efeitos antidiscinéticos resultantes do uso de inibidores de enzimas envolvidas no sistema nitrérgico possibilita inferir que a via do NO pode estar aumentada durante as LIDs. Entretanto, nossos resultados não reproduziram os achados encontrados nesses estudos. Além do pequeno número de animais utilizados nesses experimentos, devemos considerar a via de administração da L- DOPA como um fator importante.

É importante ressaltar que a via de administração da L-DOPA pode estar envolvida nos resultados obtidos. Neste estudo, a L-DOPA foi administrada com injeções via intraperitoneal, assim como no estudo em que foram utilizados camundongos citados anteriormente, no entanto todos os outros estudos utilizando ratos em que foi possível observar um efeito atenuador das LIDs pelo inibidor 7-NI, a L-DOPA foi administrada por meio de gavagem (oral). É possível que as vias de administração da L-DOPA e dos inibidores possa estar modulando os níveis discinéticos observados.

5.2. Efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na modulação das LIDs.

Os MSNs estriatais possuem altos níveis de GCs e expressam diversas isoformas de PDEs como as: PDE1B, PDE2A, and PDE10A que metabolizam ambos AMPc e GMPc, existem também as isoformas específicas para AMPc como as: PDE3A, PDE3B, PDE4D, PDE7B e PDE8B (COSKRAN et al., 2006; BENDER; BEAVO, 2006). A isoforma PDE5 também está presente nos MSNs estriatais, embora sua expressão seja muito baixa (DOMEK-LOPACINSKA; STROSZNAJDER, 2008),

Existe uma relação dos níveis de nucleotídeos cíclicos com o desenvolvimento das LIDs. Essa relação inicialmente foi demonstrada pela eficácia do inibidor da PDE5 Zaprinas na redução das discinesias. O uso desse inibidor levou a um aumento dos níveis de GMPc bloqueando a sua degradação (HARTELL, 1996;

GIORGI et al., 2008). Além disso, em modelos animais 6-OHDA discinéticos, o bloqueio da PDE5 com a administração do inibidor zaprinast (30 mg/kg s.c) preveniu parcialmente a diminuição dos níveis de AMPc e GMPc em diferentes áreas do cérebro (GIORGI et al., 2008).

Os mecanismos que envolvem as LIDs em relação a inibidores e doadores da via de sinalização do NO ainda são pouco entendidos. A capacidade de modulação dos MSNs estriatais discinéticos pelo sistema nitrérgico é evidenciada indiretamente pela administração intraestriatal dos inibidores da PDE5 zaprinast e UK-343664, que apresentaram efeitos atenuantes nas discinesias, sendo um possível alvo para restaurar o equilíbrio estriatal (PICCONI et al, 2011). Estes estudos reforçam a discussão sobre o papel do sistema nitrérgico nos mecanismos de controle motor durante a neurodegeneração característica da DP e durante a ocorrência das LIDs.

A relação da via de sinalização do NO com as LIDs é complexa, pois o NO pode exercer ações pré e pós sinápticamente, e interagir com várias vias de transdução (GARTHWAITE, 2008). O uso de doadores como o NPS que aumentam a atividade da via do NO também apresentam efeitos antidiscinéticos como demonstrado por Bortolanza et al. (2016) em que o tratamento com o doador de NO NPS (2-4 mg/kg, i.p) foi capaz de melhorar o quadro discinético dos animais tratados cronicamente com L-DOPA (20 mg/kg, oral).

Em contraposição, nossos resultados sugerem que os tratamentos dos animais discinéticos utilizando o doador de NO NPS (2m/kg) mostraram um aumento nos escores das LIDs. É importante ressaltar que a via de administração da L-DOPA foi feita de forma oral no estudo feito por Bortolanza et al. (2016), enquanto neste estudo, a aplicação ocorreu por via subcutânea. As diferentes vias de administração podem ter influenciado nos resultados observados.

O aumento da intensidade das discinesias observado em nossas análises pode estar relacionado com a modulação do NO sobre a liberação de L-DOPA no estriado. A liberação de L-DOPA estimulada pelo NO é dependente do tempo e da concentração de NPS e ocorre por um mecanismo independente de íons de cálcio (Ca^{2+}). A ação de NO na liberação de L-DOPA é mediada parcialmente por GMPc e pela formação de peroxinitrito (SANCHEZ; ABREU; GONZALEZ, 2002).

Os efeitos da L-DOPA na produção de NO na via nigroestriatal após a degradação dopaminérgica característica da DP ainda são pouco conhecidos. É sugerido que a inibição de enzimas nNOS é capaz de diminuir os efeitos tóxicos

observados em modelos com 6-OHDA nos terminais e corpos de neurônios dopaminérgicos em sub-regiões da SN (GOMES, 2008).

Estudos sugerem que a dopamina modula a liberação ou produção de NO e o uso de doadores de NO como o NPS estimulam a liberação de dopamina no estriado (ITOKAWA et al., 2006; WEST; GALLOWAY, 1998). Além disso, os efeitos do NPS sobre a liberação de dopamina foram testados em experimentos utilizando fatias do estriado de ratos, demonstrando que sua aplicação foi capaz de aumentar e diminuir a liberação de dopamina quando na presença ou ausência de antioxidantes, respectivamente (BÜYÜKUYSAL, 1997).

As análises comportamentais do teste de caminhada mostraram um aumento no número de passos realizados pelos animais sugerindo que o tratamento crônico com NPS (2 mg/kg) não interferiu com os efeitos terapêuticos da L-DOPA. Esses resultados são corroborados pelos resultados obtidos por Bortolanza et al. (2016).

5.3. Efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na excitabilidade dos MSNs

A via córtico-estriatal participa de diversas funções motoras e cognitivas e depende principalmente das interações de neurotransmissores como o glutamato e a dopamina no estriado. Alterações ocorridas no equilíbrio dessa interação desempenham um papel importante nos mecanismos que levam ao desenvolvimento de patologias como a DP (CARLSSON, M; CARLSSON, A, 1990).

As vias dMSNs e iMSNs estriatais desempenham um papel importante na circuitaria dos núcleos da base e no controle motor (BASTIDE et al., 2015). O desequilíbrio bidirecional na atividade dos MSNs demonstra que esses neurônios são fundamentais no desenvolvimento das deficiências motoras observadas na DP e nas LIDs (FEYDER; BONITO-OLIVA; FISONE, 2011).

Evidências sugerem que uma regulação positiva da sinalização de GCs-GMPc nas vias dopaminérgicas degradadas pode contribuir para as mudanças na excitabilidade neuronal e controle motor que ocorrem na DP, conseqüentemente facilitando a transmissão sináptica excitatória da via córtico-estriatal (TSENG et al., 2011; HAMMOND et al., 2007). A análise dos efeitos da lesão dopaminérgica na atividade dos MSNs obtidos através dos registros eletrofisiológicos mostraram uma

maior probabilidade de disparos evocados por estímulo cortical, associada a uma diminuição na latência dos disparos. Esses resultados sugerem uma hiperatividade nos MSNs de animais lesionados com 6-OHDA reforçando a discussão de que o aumento da atividade visto na via córtico-estriatal pode estar sendo agravado pela degeneração dopaminérgica (MALLET et al, 2006).

Foi demonstrado que a lesão nos neurônios dopaminérgicos desencadeia uma desregulação não dopaminérgica no estriado, incluindo um aumento da atividade da via de sinalização GCs – GMPc (TSENG et al, 2011). A via GCs - GMPc parece facilitar o impulso excitatório cortical para neurônios dos núcleos de saída do estriado (THRELFEL; WEST, 2013). Além disso, os déficits dopaminérgicos, a desregulação convergente de GMPc estriatal local e o controle mediado por GABA das entradas corticais é necessária para permitir a desinibição dependente da frequência da transmissão cortico-estriatal que contribui para manter a sincronização anormal da atividade dos núcleos da base parkinsonianos (JAYASINGHE et al., 2017).

A administração de drogas que elevam as concentrações dos nucleotídeos cíclicos AMPc e GMPc em MSNs como os inibidores de PDEs, ativadores de ciclase e produtores de NO, facilitam a transmissão córtico-estriatal (PADOVAN-NETO et al., 2015b; THRELFELL; WEST, 2013).

Nossas análises acerca dos efeitos do tratamento com NPS e L-DOPA na atividade dos MSNs mostrou uma facilitação na atividade da via córtico-estriatal nos MSNs, evidenciando que um provável aumento da atividade do sistema nitrérgico pode levar a um aumento da excitabilidade dos MSNs. Esses dados são corroborados por um estudo realizado por West e Grace (2004), mostrando que o aumento dos níveis endógenos intracelulares de GMPc induzido por meio da injeção de um inibidor de PDEs aumentou de forma robusta a excitabilidade de membrana dos MSNs estriatais.

A modulação dos níveis de GMPc sobre a excitabilidade dos MSNs estriatais também foi demonstrada através da administração de um inibidor da PDE10A TP-10, o acúmulo de GMPc aumentou a atividade evocada corticalmente. Posteriormente esse efeito foi bloqueado através da aplicação intraestriatal de ODQ, um inibidor seletivo da GCs como resultado da queda nos níveis de GMPc (PADOVAN-NETO et al., 2015b). Esses dados mostram que existe uma relação entre a via do NO com a modulação na excitabilidade dos MSNs estriatais.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que o tratamento com NPS associado a L-DOPA é capaz de causar uma hiperatividade da via córtico-estriatal e como consequência o aumento das LIDs. O uso de inibidores ODQ e 7-NI não mostraram efeitos anti-discinéticos, no entanto, sua eficácia foi anteriormente descrita na literatura.

O envolvimento do sistema nitrérgico nas LIDs é complexo, diversos mecanismos ainda pouco conhecidos estão envolvidos na modulação das vias do controle motor no parkinsonismo e durante as LIDs. É possível que o NPS esteja aumentando a atividade do sistema nitrérgico e como consequência aumentando a excitabilidade dos MSNs e das LIDs.

O aumento nos escores das LIDs evidenciados pelos testes comportamentais e o aumento da excitabilidade na via córtico-estriatal nos animais tratados com NPS e L-DOPA parecem estar relacionados ao aumento da disponibilidade de NO no estriado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOT, R. D.; ROSS, G. W.; WHITE, L. R.; SANDERSON, W. T.; BURCHFIEL, C. M.; KASHON, M.; SHARP, D. S.; MASAKI, K. H.; CURB, J. D.; PETROVITCH, H. Environmental, life-style, and physical precursors of clinical Parkinson's disease: recent findings from the Honolulu-Asia Aging Study. *Journal of neurology*, 250 Suppl 3, III30–III39. 2003.
- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12(10), 366–375, 1989.
- ALDERTON, W. K., COOPER, C. E, KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*, 357(Pt3), 593–615, 2001.
- BARIOTTO-DOS-SANTOS, K.; PADOVAN-NETO, F. E.; BORTOLANZA, M.; DOS-SANTOS-PEREIRA, M.; RAISMAN-VOZARI, R., TUMAS, V.; DEL-BEL, E. Repurposing an established drug: an emerging role for methylene blue in L-DOPA-induced dyskinesia. *The European journal of neuroscience*, 49(6), 869–882, 2019.
- BASTIDE, M. F.; MEISSNER, W. G.; PICCONI, B.; FASANO, S.; FERNAGUT, P. O.; FEYDER, M.; FRANCARDO, V.; ALCACER, C.; DING, Y.; BRAMBILLA, R.; FISONE, G.; JON STOESSL, A.; BOURDENX, M.; ENGELN, M.; NAVAILLES, S.; DE DEURWAERDÈRE, P.; Ko, W. K.; SIMOLA, N.; MORELLI, M.; Groc, L.; BÉZARD, E. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, 132, 96–168. 2015.
- BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews*, 58(3), 488–520. 2006
- BERNSTEIN, A. I.; GARRISON, S. P.; ZAMBETTI, G. P.; O'MALLEY, K. L. 6-OHDA generated ROS induces DNA damage and p53- and PUMA-dependent cell death. *Molecular neurodegeneration*, 6(1), 2. 2011.
- BLAND-WARD, P. A.; Moore, P. K. 7-Nitro indazole derivatives are potent inhibitors of brain, endothelium and inducible isoforms of nitric oxide synthase. *Life sciences*, 57(11), PL131–PL135, 1995.
- BLAUSEN.COM STAFF. “Medical gallery of Blausen Medical 2014”. *Wikijournal of Medicine* 1 (2).. ISSN 2002-4436. 2014.
- BORTOLANZA, M.; CAVALCANTI-KIWIATKOSKI, R.; PADOVAN-NETO, F. E.; DA-SILVA, C.; MITKOVSKI, M.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL-BEL, E. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 73, 377–387, 2015.
- BORTOLANZA, M.; BARIOTTO-DOS-SANTOS, K. D.; DOS-SANTOS-PEREIRA, M.; DA-SILVA, C. A.; DEL-BEL, E. Antidyskinetic Effect of 7-Nitroindazole and Sodium Nitroprusside Associated with Amantadine in a Rat Model of Parkinson's Disease. *Neurotoxicity research*, 30(1), 88–100. 2016.
- BROWN, H. E; FREUDENREICH, O; FAN, X; HEARD, S. O; GOFF, D; PETRIDES, G; HARRINGTON, A. L; KANE, J. M; JUDGE, H; HOEPPNE, B; FAVA, M; PERLIS, R. H. Efficacy and Tolerability of Adjunctive Intravenous Sodium Nitroprusside Treatment for Outpatients with Schizophrenia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA psychiatry*, 76(7), 691–699. 2019.

- BÜYÜKUYSAL, R. L. Effect of nitric oxide donors on endogenous dopamine release from rat striatal slices. I: Requirement to antioxidants in the medium. *Fundamental & clinical pharmacology*, 11(6), 519–527. 1997.
- CACABELOS, R. Parkinson's Disease: From Pathogenesis to Pharmacogenomics. *International journal of molecular sciences*, 18(3), 551. 2017.
- CALABRESI, P., PISANI, A., MERCURI, N. B., BERNARDI, G. The corticostriatal projection: from synaptic plasticity to dysfunctions of the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, 19(1), 19–24. 1996.
- CALABRESI, P.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G. Cellular factors controlling neuronal vulnerability in the brain: a lesson from the striatum. *Neurology*, 55(9), 1249–1255. 2000.
- CALABRESI, P; PICCONI, B; TOZZI, A; DI FILLIPPO, M Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. *Trends in neurosciences*, 30(5), 211–219. 2007.
- CALABRESI, P.; DI FILIPPO, M.; GALLINA, A.; WANG, Y.; STANKOWSKI, J. N.; PICCONI, ; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. New synaptic and molecular targets for neuroprotection in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28(1), 51–60. 2013.
- CARLSSON, M.; CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia--implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *Trends in neurosciences*, 13(7), 272–276. 1990.
- 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. *Eur J Neurosci.* (8):2694-706, 1998.
- CENCI, M. A. Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Frontiers in neurology*, 5, 242. 2014.
- COSKRAN, T. M., MORTON, D., MENNITI, F. S., ADAMOWICZ, W. O., KLEIMAN, R. J., RYAN, A. M., STRICK, C. A., SCHMIDT, C. J., STEPHENSON, D. T. Immunohistochemical localization of phosphodiesterase 10A in multiple mammalian species. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 54(11), 1205–1213. 2006.
- DAUER W., PRZEDBORDK S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*. 39(6):889-909. 2003
- DEL-BEL, E.; PADOVAN-NETO, F. E.; RAISMAN-VOZARI, R.; LAZZARINI, M. Role of nitric oxide in motor control: implications for Parkinson's disease pathophysiology and treatment. *Current pharmaceutical design*, 17(5), 471–488, 2011.
- DELONG, M. R. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in Neurosciences*, 13(7), 281–285. 1990
- DELONG, M. R., WICHMANN, T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology*, 64(1), 20–24. 2007.
- DOMEK-TOPACINSKA, K.; STROSZNAJDER, J. B. The effect of selective inhibition of cyclic GMP hydrolyzing phosphodiesterases 2 and 5 on learning and memory processes and nitric oxide synthase activity in brain during aging. *Brain research*, 1216, 68–77. 2008.

- DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1357–1391. 2011.
- FABBRINI, G.; BROTCHE, J. M.; GRANDAS, F.; NOMOTO, M.; GOETZ, C. G. Levodopa-induced dyskinesias. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 22(10), 1379–1523. 2007.
- FEDELE E., JIM Y, VARNIER G, RAITERli M. In vivo microdialysis study of a specific inhibitor of soluble guanylyl cyclase on the glutamate receptor/nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Br J Pharmacol*.119(3):590-4, 1996.
- FERNANDEZ, R. et al. Levodopa-induced changes in synaptic dopamine levels increase with progression of Parkinson's disease: implications for dyskinesias. *Brain* 127:2747–2754, 2004.
- FEYDER, M., BONITO-OLIVA, A., FISONE, G. L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 71. 2011.
- FERRAZ, H. B. Agonistas Dopaminérgicos no tratamento da Doença de Parkinsons. *Revista Neurociências*, [S. I.], v. 12, n. 4, p. 192–197, 2004.
- GARTHWAITE, J. Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. *The European journal of neuroscience*, 27(11), 2783–2802. 2008.
- GERDEMAN, G. L; ROSENI, J; LOVINGER, D. M. Postsynaptic endocannabinoid release is critical to long-term depression in the striatum. *Nature neuroscience*, 5(5), 446–451. 2002.
- GHIGLIERI, V.; BAGUETTA, V.; PENDOLINO, V.; PICCONI, B.; CALABRESI, P. Corticostriatal Plastic Changes in Experimental L-DOPA-Induced Dyskinesia, *Parkinson's Disease*, vol. 2012, Article ID 358176, 10 pages, 2012.
- GIORGI, M., D'ANGELO, V., ESPOSITO, Z., NUC CETELLI, V., SORGE, R., MARTORANA, A., STEFANI, A., BERNARDI, G., & SANCESARIO, G. Lowered cAMP and cGMP signaling in the brain during levodopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: new aspects in the pathogenetic mechanisms. *The European journal of neuroscience*, 28(5), 941–950. 2008.
- GIOVINAZZO, D.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Nitric Oxide. In *Encyclopedia of the Neurological Sciences* (pp. 597-600). Elsevier Inc. 2014.
- GOLDMAN, S. M., MAREK, K., OTTMAN, R., MENG, C., COMYNS, K., CHAN, P., ... TANNER, C. M. Concordance for Parkinson's Disease in Twins: a 20-Year Update. *Annals of Neurology*. 2019.
- GOMES, M. Z.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. A. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. *Brain research*, 1203, 160–169, 2008.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções*. *Revista da Associação Médica Brasileira* [online], v. 46, n. 3, pp. 265-271. 2000.
- HALLAK, J. E., MAIA-DE-OLIVEIRA, J. P., ABRAO, J., EVORA, P. R., ZUARDI, A. W., CRIPPA, J. A., BELMONTE-DE-ABREU, P., BAKER, G. B., DURSUN, S. M. Rapid improvement of acute schizophrenia symptoms after intravenous sodium nitroprusside: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA psychiatry*, 70(7), 668–676. 2013.

- HAMMOND, C.; BERGMAN, H.; BROWN, P. Pathological synchronization in Parkinson's disease: networks, models and treatments. *Trends in neurosciences*, 30(7), 357–364, 2007.
- HARRIS, J.P.; BURRELL, J.C.; STRUZYNA, L.A. et al. Emerging regenerative medicine and tissue engineering strategies for Parkinson's disease. *npj Parkinsons Dis.* 6, 4. 2020.
- HARTELL, N. Inhibition of cGMP Breakdown Promotes the Induction of Cerebellar Long-Term Depression. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 16. 2881-90.1996.
- HAYES M. T. Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American journal of medicine*, 132(7), 802–807. 2019.
- HOTTINGER, D. G.; BEEPE, D. S.; KOZHIMANNIL, T.; PRIELIPP, R. C.; BELANI, K. G. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review. *Journal of anesthesiology, clinical pharmacology*, 30(4), 462–471. 2014.
- ITOKAWA, K., OHKUMA, A., ARAKI, N., TAMURA, N., & SHIMAZU, K. Effect of L-dopa on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice. *Neuroscience Letters*, 402(1-2), 142–144. 2006.
- IVANKOVICH, A. D.; MILETICH, D. J.; TINKER, J. H. Sodium nitroprusside: metabolism and general considerations. *International anesthesiology clinics*, 16(2), 1–29. 1978.
- JANKOVIC, J., STACY, M. Medical Management of Levodopa-Associated Motor Complications in Patients with Parkinson's Disease. *CNS Drugs*, 21, 677-692. 2007
- JAYASINGUE, V. R. et al. Frequency-Dependent Corticostriatal Disinhibition Resulting from Chronic Dopamine Depletion: Role of Local Striatal cGMP and GABAAR Signaling. 2017.
- KALIA, L. V., LANG, A. E. Parkinson's disease. *Lancet (London, England)*, 386(9996), 896–912. 2015.
- KUHN, W., WINKEL, R., WOITALLA, D., MEVES, S., PRZUNTEK, H., MÜLLER, T. High prevalence of parkinsonism after occupational exposure to lead-sulfate batteries. *Neurology*, 50(6), 1885–1886. 1998.
- LANCIEGO, J. L.; LUQUIN, N.; OBESO, J. A. Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2(12), a009621. 2012.
- LUNDBLAD, M; ANDERSSON, M; WINKLER, C; KIRIK, D; WIERUP, N; CENCI, M. A. Pharmacological validation of behavioral measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, 15(1), 120–132. 2002.
- MALLET N., BALLION B., LE MOINE C., GONON F. Cortical inputs and GABA interneurons imbalance projection neurons in the striatum of parkinsonian rats. *Journal of Neuroscience* ;26(14):3875–84, 2006.
- MARTINEZ-MARTIN, P., RODRIGUEZ-BLAZQUEZ, C., KURTIS, M. M., CHAUDHURI, K. R., NMSS VALIDATION GROUP. The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 26(3), 399–406. 2011.
- MCFARLAND N. R. Diagnostic Approach to Atypical Parkinsonian Syndromes. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*, 22(4 Movement Disorders), 1117–1142. 2016.

- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *British journal of pharmacology*, 147 Suppl 1(Suppl 1), S193–S201. 2006.
- OLSSON, M., NIKKHAH, G., BENTAGLE, C., BJÖRKLUND, A. Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. *J Neurosci*. 15(5 Pt 2):3863-75, 1995.
- PADOVAN-NETO, F.E., ECHEVERRY, M.B., TUMAS, V., DEL-BEL, E.A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 159, 927–935, 2009.
- PADOVAN-NETO, F.E., CAVALCANTI-KIWIATKOVISKI R, CAROLINO, R.O, et al. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology*; 89:87-99, 2014.
- PADOVAN-NETO, F. E. et al. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-dopa-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology*, v. 89, p. 87–99, 2015a.
- 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. *J Neurosci*. 35, 5781-91, 2015b.
- PAGE IH, CORCORAN AC, DUSTAN HP, KOPPANYI T. Cardiovascular actions of sodium nitroprusside in animals and hypertensive patients. *Circulation*. Feb;11(2):188-98. 1955.
- PAXINOS, G.; WATSON, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. [s.l.] Elsevier, 2007.
- PICCONI, B; CENTONZE, D; HAKANSSON, K; BERNARDI, G; GREENGARD, P; FISONE, G; CENCI, M. A; CALABRESI, P. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature neuroscience*, 6(5), 501–506. 2003.
- PICCONI, B; BAGETTA, V; GHIGLIERI, V. et al. Inhibition of phosphodiesterases rescues striatal long-term depression and reduces levodopa-induced dyskinesia. *Brain*; 134: 375–87, 2011.
- PINKHAM, A; LOUGHEAD, J; RUPAREL, K; WU, W. C; OVERTON, E; GUR, R. Resting quantitative cerebral blood flow in schizophrenia measured by pulsed arterial spin labeling perfusion MRI. *Psychiatry research*, 194(1), 64–72. 2011.
- PORRINI, C.; RAMARAO, N.; TRAN, S. Dr. NO and Mr. Toxic – the versatile role of nitric oxide. *Biological Chemistry*, 401, 547 - 572. 2019.
- QUEIROZ, SALETE LINHARES; BATISTA, ALZIR AZEVEDO. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quím. Nova, São Paulo*, v. 22, n. 4, p. 584-590. 1999.
- RINDONE, J. P.; SLOANE, E. P. Cyanide toxicity from sodium nitroprusside: risks and management. *The Annals of pharmacotherapy*, 26(4), 515–519. 1992.
- SANCHEZ, J. J.; ABREU, P.; GONZALEZ, M. C. Sodium nitroprusside stimulates L-dopa release from striatal tissue through nitric oxide and cGMP. *European Journal of Pharmacology*, 438(1-2), 79–83. 2002.
- SENATORE, ROSA. *The role of Basal Ganglia and Cerebellum in motor learning: A computational model*. 2012.
- SHERGILL, J. K., CAMMACK, R., COOPER, C. E., COOPER, J. M., MANN, V. M., & SCHAPIRA, A. H. V. Detection of Nitrosyl Complexes in Human Substantia Nigra, in Relation to Parkinson's Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 228(2), 298–305. 1996.

- SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 11(3-4), 151–167. 2007.
- SOLÍS, O., ESPADAS, I., DEL-BEL, E. A., MORATALLA, R. Nitric oxide synthase inhibition decreases L-dopa-induced-dyskinesia-and the expression of striatal molecular markers in Pitx3(-/-) aphakia mice. *Neurobiol Dis*, 73, 49-59. 2015.
- STOCCO, A.; LEBIERE, C.; ANDERSON, J. R. Conditional routing of information to the cortex: A model of the basal ganglia's role in cognitive coordination. *Psychological Review*, 117(2), 541–574. 2010.
- TAKUMA, K.; TANAKA, T; TAKAHASHI, T; HIRAMATSU, N; OTA, Y; AGO, Y; MATSUDA, T. Neuronal nitric oxide synthase inhibition attenuates the development of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-Parkinsonian rats. *European journal of pharmacology*, 683(1-3), 166–173. 2012.
- THRELFELL, S. et al. Inhibition of Phosphodiesterase 10A Increases the Responsiveness of Striatal Projection Neurons to Cortical Stimulation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 328, n. 3, p. 785–795, 2009.
- THRELFELL, S.; WEST, A. R. Review: Modulation of striatal neuron activity by cyclic nucleotide signaling and phosphodiesterase inhibition. *Basal ganglia*, 3(3), 137–146. 2013.
- TIEU K. A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011 Sep;1(1): a009316. doi: 10.1101/cshperspect. a009316. PMID: 22229125; PMCID: PMC3234449.
- TSENG, K.Y., CABALLERO, A., DEC, A., CASS, D. K., SIMAK, N., SUNU, E. et al. Inhibition of Striatal Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Reverses Basal Ganglia Dysfunction and Akinesia in Experimental Parkinsonism. *PLoS ONE* 6(11): e27187. 2011.
- TSOU, K., SNYDER, G., GREENGARD, P. Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein in the substantia nigra. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3462–3465, 1993.
- WANG, J.; WANG, F.; MAI, D.; QU, S. Molecular Mechanisms of Glutamate Toxicity in Parkinson's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 14, 585584, 2020.
- WEST, A. R.; GALLOWAY, M. P. Nitric oxide and potassium chloride-facilitated striatal dopamine efflux in vivo: role of calcium-dependent release mechanisms. *Neurochemistry international*, 33(6), 493–501, 1998.
- WEST, A. R.; GRACE, A. A. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of the midbrain dopamine neurons in vivo. *Journal of Neurophysiology*, v.83, n.4, p. 1796-1808. 2000.
- WEST, A. R.; GRACE, A. A. Opposite influences of endogenous dopamine D1 and D2 receptor activation on activity states and electrophysiological properties of striatal neurons: studies combining in vivo intracellular recordings and reverse microdialysis. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(1), 294–304, 2002.
- WEST, A.R; GRACE, A. A. The nitric oxide-guanylyl cyclase signaling pathway modulates membrane activity States and electrophysiological properties of striatal medium spiny neurons recorded in vivo. *J Neurosci* 24:1924–1935, 2004.
- WINKLER, C.; Kirik, D.; BJÖRKLUND, A.; CENCI, M. A. 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*, 10(2), 165–186. 2002.

WIRDEFELT, K., ADAMI, H. O., COLE, P., TRICHOPOULOS, D., MANDEL, J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *European journal of epidemiology*, 26 Suppl 1, S1–S58. 2011.