



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANA THAIS ARAÚJO DA SILVA

**EFEITO ANTIDISCINÉTICO DO MRS2500, ANTAGONISTA DOS
RECEPTORES P2Y1, EM RATOS COM PARKINSONISMO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR 6-OHDA E TRATADOS COM L-DOPA**

FORTALEZA

2021

ANA THAIS ARAÚJO DA SILVA

**EFEITO ANTIDISCINÉTICO DO MRS2500, ANTAGONISTA DOS
RECEPTORES P2Y1, EM RATOS COM PARKINSONISMO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR 6-OHDA E TRATADOS COM L-DOPA**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de doutor em
Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de
Andrade.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S578e silva, Ana thais araujo.
Efeito antidiscinético do MRS2500, antagonista dos receptores P2Y1, em ratos com parkinsonismo experimental induzido por 6-OHDA e tratados com L-DOPA / Ana thais araujo silva. – 2021.
110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2021.

Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andradde.

1. Discinesia, L-DOPA, MRS2500, Parkinson. I. Título.

CDD 615.1

ANA THAIS ARAÚJO DA SILVA

**EFEITO ANTIDISCINÉTICO DO MRS2500, ANTAGONISTA DOS
RECEPTORES P2Y1, EM RATOS COM PARKINSONISMO EXPERIMENTAL
INDUZIDO POR 6-OHDA E TRATADOS COM L-DOPA**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de doutor em
Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade.(Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra Paula Margarida Gomes Canas
Universidade de Coimbra (UC)

Prof. Dr. Rui Daniel Schroder Prediger
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dra Fernanda Martins Maia Carvalho
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dra Marta Regina Santos Do Carmo
Centro Universitário Inta (UNINTA)

À Deus.

À minha mãe, minha mentora e heroína.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por tanto amor que chega a me constranger.

À minha mãe por todo o incentivo aos estudos, sem ela eu nada seria. Ao meu filho Gabriel por ser a luz da minha vida e ser o sentido de tudo. Ao meu amor, amigo e companheiro de vida, Giucipe, por toda a ajuda, incentivo e força nessa caminhada.

À professora Geanne por todos os ensinamentos, incentivos, oportunidades e por me inspirar de todas as formas.

Aos colegas do Laboratório de Neurociência e Comportamento pelas reflexões, críticas e sugestões. Um agradecimento especial ao Arnaldo por toda ajuda e carinho e a Laura por tanta disponibilidade e paciência.

À UFC, minha eterna gratidão pois durante anos, desde a graduação, é minha segunda casa, onde todas as bolsas de iniciação científica, bolsa de mestrado, doutorado e sem esquecer da deliciosa comida do RU, me ajudaram a seguir nessa longa jornada da melhor maneira possível...E como foi bom!

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Obrigada a todos por me ajudarem a transpor mais uma etapa.

É graça divina começar bem.
Graça maior persistir na caminhada certa.
Mas, graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Helder Câmara

RESUMO

EFEITO ANTIDISCINÉTICO DO MRS2500, ANTAGONISTA DOS RECEPTORES P2Y1, EM RATOS COM PARKINSONISMO EXPERIMENTAL INDUZIDO POR 6-OHDA E TRATADOS COM L-DOPA

A discinesia é o principal efeito adverso do tratamento crônico com L-DOPA em pacientes com Doença de Parkinson, sendo clinicamente caracterizada por picos de movimentos involuntários anormais coincidentes com o pico de ação da L-DOPA. Visto que o ATP participa no controle da liberação de dopamina no corpo estriado através da ativação de seus receptores, o objetivo deste trabalho foi estudar o possível efeito anti-discinético do antagonista do receptor P2Y1, o MRS2500, na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA (LID). Foram utilizados 70 ratos, *Wistar*, machos (250-300 g), divididos em cinco grupos: 1. falso-operado, 2. falso-operado tratado com MRS2500, 3. animais operados que receberam a 6-OHDA (18 µg/3µL intraestriatal), denominados de parkinsonianos; 4. parkinsonianos tratados com L-DOPA (30mg/kg), denominados discinéticos e 5. discinéticos tratados com MRS2500 (2 nmol/µl). O modelo experimental de DP foi induzido pela injeção de 6-OHDA no corpo estriado dos animais através de cirurgia estereotáxica. Os tratamentos com L-DOPA e MRS2500 iniciaram-se no 15º dia após a cirurgia e foram realizados durante 22 dias. A L-DOPA foi administrada diariamente via oral e o MRS2500 foi administrado no estriado por infusão contínua através de mini bombas de infusão. A avaliação dos movimentos involuntários anormais (AIMs) foi realizada nos dias 21, 28 e 35 após a cirurgia e a coordenação motora no 36º dia. Para entender o mecanismo de ação anti-discinético do MRS2500 foram avaliados a degeneração neuronal, através da imunomarcagem para tirosina hidroxilase, alterações no transportador de dopamina (DAT) e a neuroinflamação (astrogliose e microgliose). O MRS2500 diminuiu os AIMs em animais discinéticos e melhorou o desempenho de coordenação motora. Além disso, o MRS2500 diminuiu significativamente a astrogliose, microgliose e aumento da imunomarcagem para COX-2, induzidos pela L-DOPA. Portanto, nossos resultados sugerem que os receptores purinérgicos P2Y1 desempenham importante papel no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA, e que o MRS2500 impediu a discinesia por um mecanismo que envolve de diminuição da neuroinflamação.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. 6-hidroxi dopamina. LID. L-DOPA. Receptor P2Y1. MRS2500.

ABSTRACT

ANTIDYSKINETIC EFFECT OF MRS2500, ANTAGONIST OF P2Y1 RECEPTORS, IN RATS WITH EXPERIMENTAL PARKINSONISM INDUCED BY 6-OHDA AND TREATED WITH L-DOPA

Dyskinesia is the major adverse effect of L-DOPA chronic treatment in Parkinson's disease patients, characterized by peaks of abnormal involuntary movements coinciding with L-DOPA peak of action. Since ATP plays an important role in the control of striatum dopamine release by purine receptors activation, the aim of this study was the evaluation of the possible anti-dyskinetic effect of the MRS2500, a P2Y1 receptor antagonist, in the pathophysiology of L-DOPA-induced dyskinesia (LID). 70 male Wistar rats (250-300g) were used, divided into five groups: 1. False-operated, 2. False-operated treated with MRS2500, 3. Operated animals that received 6-OHDA (18 µg/3 µL) intrastriatally, called Parkinsonian; 4. Parkinsonian treated with L-DOPA (30mg/kg) orally, called dyskinetic, and 5. Dyskinetic treated with MRS2500 (2 nmol/µl). The experimental model was induced by 6-OHDA injection in the animals' striatum through stereotaxic surgery. The treatment with L-DOPA and/or MRS2500 were initiated on the 15th day after surgery, followed for 22 days. L-DOPA was administered daily orally and MRS2500 was administered in the striatum by continuous infusion through mini infusion pumps. The evaluation of abnormal involuntary movements (AIMs) was performed on the 21st, 28th and 35th days after surgery, followed by motor coordination evaluation on the 36th day. In order to understand the mechanistic underlying the MRS2500 anti-dyskinetic effect we evaluated neuronal degeneration, by tyrosine hydroxylase (TH) immunostaining, dopamine transporters (DAT) alterations, and neuroinflammation (astrogliosis, microgliosis and COX-2). MRS2500 decreased AIMs on dyskinetic animals and improved motor coordination performance. In addition, MRS2500 prevented significantly decreased astrogliosis, microgliosis and COX-2 immunostaining, enhanced by L-DOPA treatment. Thus, our results suggests that P2Y1 purinergic receptors play an important role in the development of L-DOPA-induced dyskinesia. Moreover, the anti-dyskinetic effect of P2Y1 receptors blockade by MRS2500 is probably due to its activity against neuroinflammation.

Keywords: Parkinson's disease. 6-hydroxydopamine. LID. L-DOPA. P2Y1 receptor. MRS2500

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Vias dopaminérgicas.....	15
Figura 2	Os tratamentos atuais da DP.....	16
Figura 3	Rotas da dopamina (DA) no sistema dopaminérgico intacto (A) e lesionado na DP (B).....	20
Figura 4	Desenho esquemático representativo da organização clássica dos circuitos dos núcleos da base no cérebro normal, de indivíduos com DP e discinesia.....	22
Figura 5	Estrutura molecular do MRS2500.....	31
Figura 6	Desenho experimental.....	36
Figura 7	Subtipos de AIMs.....	40
Figura 8	Aparelho de Rotarod.....	41
Figura 9	Número de rotações induzidas pela apomorfina em ratos parkinsonianos.....	45
Figura 10	O MRS2500 impediu o desenvolvimento de ALO AIMs após 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	48
Figura 11	O MRS2500 impediu o desenvolvimento de AIMs locomotores após 14º e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	50
Figura 12	O MRS2500 impediu o desenvolvimento de AIMs totais após o 7º, 14º e 21º dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	53
Figura 13	Desempenho de coordenação motora de animais hemi-parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	54
Figura 14	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 2nmol/µl (i.c.v.) sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	56
Figura 15	Imunomarcção para TH no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA e do MRS2500 em animais parkinsonianos.....	56
Figura 16	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	57
Figura 17	Imunomarcção para TH no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e do MRS2500 em animais parkinsonianos.....	57
Figura 18	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcção para DAT no corpo	59

estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos

Figura 19	Quantificação da imunomarcção para DAT no mesencéfalo e corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos.....	59
Figura 20	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcção para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsoniano.....	60
Figura 21	Quantificação da imunomarcção para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos.....	60
Figura 22	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcção para COX-2 no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	62
Figura 23	Quantificação do número de células COX-2 positivas no corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	62
Figura 24	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcção para COX-2 no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	63
Figura 25	Quantificação do número de células COX-2 positivas no mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	63
Figura 26	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	65
Figura 27	Quantificação da imunofluorescência para CD11b no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos.....	65
Figura 28	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	66
Figura 29	Quantificação da imunofluorescência para CD11b no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos.....	66
Figura 30	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcção por GFAP no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	68

Figura 31	Quantificação da imunofluorescência para GFAP no corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	68
Figura 32	Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcção por GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	69
Figura 33	Quantificação da imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Protocolo de Tratamento	35
Tabela 2	Sítios de lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HT-1	Receptor de serotonina tipo 1
6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
AIMs	Movimentos involuntários anormais
ALO AIMs	Movimentos involuntários anormais axiais, de membro e orolinguais
AMPc	Adenosine monofosfatocíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BBG	Brilliant Blue G
COMT	Catecol-O-metil transferase
COX-2	Ciclooxigenase2
CREB	Proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
D1	Receptor dopaminérgico tipo 1
D2	Receptor dopaminérgico tipo 2
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol

DARPP32	Fosfoproteína neuronal regulada por dopamina e AMPc
DAT	Transportador de dopamina
DOPAC	3,4-diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
EPM	Erro padrão da média
ERK	Proteínas quinase regulada por sinalização extracelular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HVA	Ácido homovalínico
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	Inositoltri-fosfato
L-DOPA	3,4-dihidroxi-L-fenilalanina

MAO-B	Monoaminoxidase B
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NAc	Núcleo accumbens
PBS	Salina + Tampão fosfato
PKA	Fosfoquinase A
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
STN	Núcleo subtalâmico
TH	Tirosina hidroxilase

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca Registrada

% Porcentagem

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1	Doença de Parkinson.....	14
1.2	Terapêutica da Doença de Parkinson.....	16
1.3	Discinesia induzida por L-DOPA.....	17
1.4	Mecanismos fisiopatológicos da discinesia induzida por L-DOPA.....	18
1.4.1	Neuroinflamação na DP e LID.....	25
1.5	Modelos experimentais de DP e de discinesia induzida por L-DOPA em animais.....	27
1.6	Receptores Purinérgicos e LID.....	29
2	Relevância e Justificativa.....	32
3	Objetivos.....	33
3.1	Objetivos Gerais.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4	Metodologia.....	34
4.1	Animais.....	34
4.2	Drogas.....	34
4.3	Protocolo Experimental.....	34
4.4	Técnica de implantação das bombas de infusão.....	36
4.5	Lesão intraestriatal por 6-OHDA.....	38
4.6	Teste rotacional induzido por apomorfina.....	39
4.7	Movimentos involuntários anormais.....	39

4.8	Avaliação da coordenação motora – teste de rotarod.....	41
4.9	Análise imuno-histoquímica.....	42
4.9.1	Imunomarcção para TH, DAT e COX-2.....	42
4.9.2	Imunofluorescência para GFAP, CD11-b.....	43
4.10	Análise estatística.....	44
5	Resultados.....	45
5.1	Avaliação do número de rotações induzida pela apomorfina para seleção dos animais parkinsonianos.....	45
5.2	Efeito do MRS2500 2nmol/μl (i.c.v.) sobre o desenvolvimento de ALO AIMs após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	46
5.3	Efeito do MRS2500 2nmol/μl (i.c.v.) sobre o desenvolvimento de AIMs locomotores após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	49
5.4	Efeito do MRS2500 2nmol/μl (i.c.v.) sobre o desenvolvimento de AIMs Totais no 7º, 14º e 21º dia após o início da administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos: curva de tempo após uma dose de L-DOPA.....	51
5.5	Efeito do MRS2500 2nmol/μl (i.c.v.) sobre a coordenação motora de ratos parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg).....	54
5.6	Efeito do MRS2500 2nmol/μl (i.c.v.) sobre a morte neuronal avaliada através da imunomarcção por TH no mesencéfalo e no corpo estriado de ratos parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	55
5.7	Efeito do MRS2500 2nmol/μl (i.c.v.) sobre a imunomarcção para DAT no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	58

5.8	Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a neuroinflamação avaliada através da imunomarcagem de COX-2 no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos..	61
5.9	Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre ativação de micróglia avaliada através da imunomarcagem por CD11b no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.	64
5.10	Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre ativação de astrócitos avaliada através da imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.....	67
6	Discussão.....	70
7	Conclusão.....	79
	Referências.....	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

Os sinais e sintomas da Doença de Parkinson (DP) foram descritos pela primeira vez por James Parkinson em 1817 em seu manuscrito “Ensaio sobre a paralisia agitante”. Somente em 1920 que Jean-Martin Charcot reconheceu o pioneirismo do pesquisador na descrição da paralisia agitante denominando-a com o nome do seu descobridor, Parkinson (OBESO, 2018).

A Doença de Parkinson, que surge principalmente com o envelhecimento, é a segunda doença neurodegenerativa em termos de incidência na população mundial. Prevalence na população masculina, em países industrializados, atingindo aproximadamente 0,3% da população (GEORGIEV *et al.*, 2017). Em se tratando da população de 60 anos de idade esse número aumenta 1% e população com mais de 80 anos 4%. A doença se manifesta em torno dos 60 anos de idade mas, 10% dos casos classificados como precoce acontece em torno dos 20 a 50 anos de idade (ELBAZ *et al.*, 2016). Apesar de não possuir altas taxas de incidência e prevalência, estima-se que em 2030 o número de indivíduos com a doença suba para mais que o dobro (OBESO *et al.*, 2018).

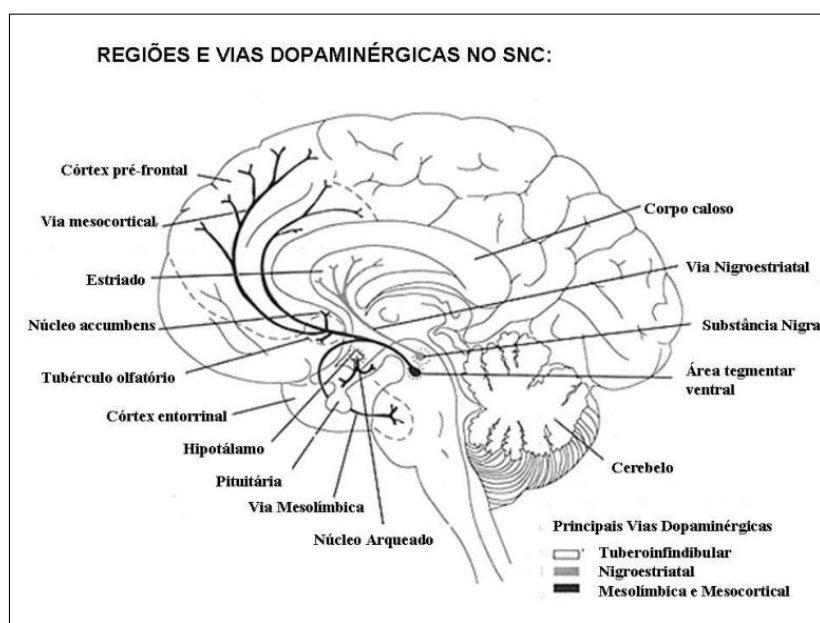
O tremor de repouso, acinesia, rigidez e problemas posturais são características clínicas da DP (WIRDEFELD *et al.*, 2011; MORIGUCHI *et al.*, 2012, TYSNES; STORSTEIN, 2017). Estes sinais clínicos começam inicialmente de forma unilateral e depois progridem para o lado oposto. Os sintomas não motores, como a insuficiência autonômica, normalmente se desenvolvem depois com as complicações psiquiátricas, do sono e cognitivas (FERNANDEZ, *et al.*, 2017; GOODARZI E ISMAIL, 2017). Patologicamente caracteriza-se por uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos da região *pars compacta* da substância negra levando à perda de dopamina no corpo estriado. A presença de corpúsculos de Lewy, inclusões de proteína, principalmente de α -sinucleína no citoplasma intraneural também está relacionada com o desenvolvimento da DP. Estas inclusões ocorrem principalmente no *locus ceruleus*, núcleos basais, hipotálamo, córtex cerebral, núcleos motores dos nervos cranianos e em componentes centrais e periféricos do sistema nervoso autônomo (WIRDEFELD *et al.*, 2011; PAL *et al.*, 2011).

São três as vias dopaminérgicas, a via mesocorticolímbica, que emite projeções da área tegmental ventral do mesencéfalo para o córtex cerebral, núcleo accumbens e outras estruturas límbicas, que estão responsáveis pela motivação, pensamento orientado para metas, regulação do afeto e reforço positivo, a segunda via é a nigroestriatal que envia projeções do

mesencéfalo para o corpo estriado, que é responsável principalmente pela função motora, e a terceira via é a túbero-infundibular, onde os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos estão situados nos núcleos arqueados e paraventriculares do hipotálamo sendo responsáveis pelo controle da liberação de prolactina (GOLAN, 2009).

A via nigroestriatal é onde está contida oitenta por cento da dopamina no cérebro, com isso, é a via mais afetada na DP, sendo formada por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putâmem, correspondendo ao corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005) (Figura 1). No corpo estriado de pacientes com DP há uma redução dos níveis de DA e de seus metabólitos, como o ácido homovalínico (HVA) e 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC). Também se observa a redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e a dopa-descarboxilase (LANG; LOZANO, 1998; MIZUNO, 1999; GERLACH E RIEDERER, 1996).

Figura 1 Vias dopaminérgicas



Adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017

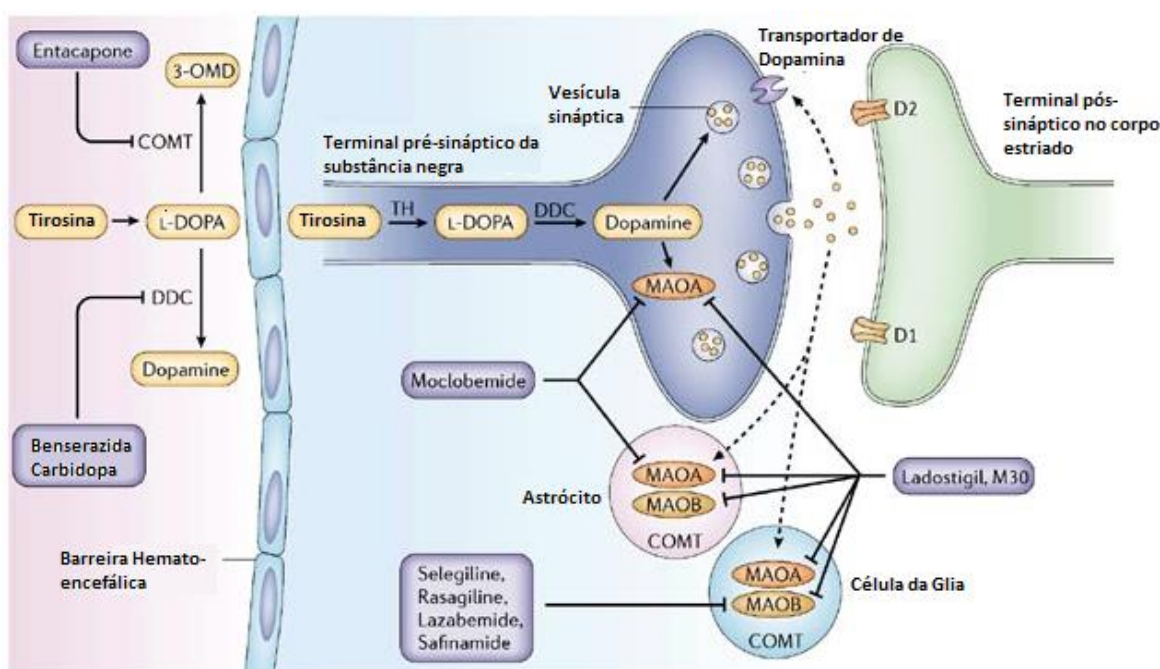
Atualmente, a DP é considerada uma doença multifatorial complexa em que fatores genéticos, sejam variantes causais ou de suscetibilidade, fatores ambientais desconhecidos e a interação de ambos poderia, em última instância, desencadear a patologia (DEL REY, 2018). Estudos mostram que a exposição a agrotóxicos como toxinas sintéticas, pesticidas e metais pesados podem ser a causa da DP, porém, a maioria das pessoas está exposta a tais agrotóxicos e

nem todos desenvolvem o parkinson sugerindo que os fatores necessários para desenvolvermos parkinson sejam mais complexos (FERNAUGT, 2017). Além desses fatores, o estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas e a inflamação podem contribuir para o processo neurodegenerativo (TÓTH, *et al.*, 2019).

1.2 Terapêutica da Doença de Parkinson

O tratamento para a doença de Parkinson consiste em principalmente três estratégias: a reposição da dopamina, a inibição de sua degradação e o uso de agonistas dopaminérgicos. Há mais de 50 anos após a sua introdução na terapia para a doença a Parkinson, a L-DOPA até hoje continua sendo a terapia não invasiva mais efetiva no tratamento dos sintomas motor da DP (CENCI, 2017), associada a inibidores da dopa-descarboxilase periférica, como a carbidopa e a benserazida, sendo o tratamento de primeira escolha (HUOT *et al.*, 2013) (Figura 2).

Figura 2 Os tratamentos atuais da DP.



Adaptado de Youdimet *et al.* (2006).

A terapia com L-DOPA é um grande desafio devido sua farmacocinética e farmacodinâmica. A absorção, metabolização e distribuição causam um grande impacto na sua biodisponibilidade, da dose administrada por via oral, apenas 1% entra no cérebro para atuar efetivamente na transmissão dopaminérgica, e a meia-vida da L-DOPA atinge apenas uma hora.

A associação com a carbidopa e a benzerazida reduzem sua depuração plasmática, prolongando assim sua meia-vida para cerca de 90 minutos, aumentando seu efeito clínico e reduzindo a dosagem geral necessária de 60-80% , essa associação melhora o perfil de tolerabilidade da L-DOPA, minimizando os efeitos da descarboxilação periférica em dopamina circulante, como náuseas, vômitos, hipotensão (TAMBASCO, 2018).

O principal efeito adverso da L-DOPA está relacionada com o seu uso a longo prazo que é frequentemente associado a flutuações motoras e não motoras que se desenvolvem em até 75% dos pacientes após 4 a 6 anos de tratamento, impactando negativamente na qualidade de vida destes, levando-os muitas vezes a diminuir ou até mesmo interromper o tratamento (BASTIDE *et al.*, 2015). Essas flutuações clínicas são caracterizadas por encurtamento ou inconsistência do efeito da L-DOPA, as mais comuns são o fenômeno de “*wearing-off*”, que representa o encurtamento da resposta, o fenômeno de “*on-off*”, onde o paciente flutua entre os estados “*on*”, no qual ocorre a ação da L-DOPA, e estado “*off*”, onde a L-DOPA para de ter ação. Outra forma de flutuação bastante comum é o fenômeno de “*freezing*” onde existe uma incapacidade momentânea de iniciar ou de executar um movimento que pode comprometer a locomoção, a fala e o movimento das mãos (RINGENDAHL; SIERLA, 1997; JENNER, 2013; LEWITT; FAHN, 2016).

Outros fármacos também são usados na terapia da doença de Parkinson como agonistas dos receptores de DA (ex. pramipexol), inibidores da MAO-B (ex. selegilina), antivirais com influência na síntese da DA (ex. amantadina), inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) (ex. entacapone) e anticolinérgicos (ex. triexifenidila) (ALDAKHEEL, *et al.*, 2014)

1.3 Discinesia induzida por L-DOPA

Por décadas o padrão de tratamento para DP foi com levodopa (L-DOPA), que eleva os níveis de dopamina na via nigroestriatal, melhorando o movimento e as funções motoras coordenadas. O uso crônico da L-DOPA resulta em complicações motoras, incluindo discinesia induzida por levodopa (LID- L-DOPA- *induced dyskinesia*), que ocorrem em pelo menos 50% dos pacientes após 5 a 10 anos de tratamento (MARTINI, *et al.*, 2019). A LID é descrita como movimentos anormais involuntários incapacitantes que podem ser uma mistura de coreia, balismo, distonia e, em menor grau, contração muscular súbita e involuntária nas mãos e nos pés (JENNER, 2008).

As discinesias enfrentadas pelos pacientes em tratamento com L-DOPA são movimentos involuntários diferentes do tremor. São agrupadas quanto a atividade de dopamina em: discinesias do tipo “*off*”, quando há baixos níveis de dopamina, e discinesias do tipo “*on*”, onde há níveis elevados de dopamina. Sob o ponto de vista fenomenológico as discinesias do tipo “*off*” são distonias dolorosas, na forma de um movimento anormal caracterizado por contrações musculares anormais padronizadas, que produzem movimentos de torção ou posturas anormais. Este tipo de discinesia ocorre geralmente à noite ou ao acordar. A discinesia do tipo “*on*” compreende usualmente em coréia, distonia e estereotipia. Este tipo de discinesia é ainda subdividido no grupo em que a manifestação mais comum é a coréia, relacionada com o pico de dose de L-DOPA, e em um segundo subgrupo onde há ocorrência maior de distonia e estereotipia, associada ao decaimento dos níveis plasmáticos da droga, chamada discinesia bifásica (JENNER, 2013). A coréia é caracterizada como um movimento involuntário, irregular, sem propósito, não ritmado, abrupto e rápido que parece sair de uma região para outra do corpo. A distonia é a segunda forma mais comum de discinesia e é caracterizada pela contração sustentada de músculos agonistas ou antagonistas podendo envolver grupos de músculos secundários (BASTIDE *et al.*, 2015).

Vários fatores têm sido associados ao desenvolvimento de discinesia, incluindo doses mais elevadas e duração mais longa da terapia com levodopa, isso devido à estimulação fásica de modo crônico de receptores pós-sinápticos dopaminérgicos, o que nos mostra um número considerável de pessoas que irão apresentar a LID ao longo do tratamento. Outros fatores associam a gravidade da doença e idade de início, pois os pacientes nessas condições apresentam uma neurodegeneração significativa. Assim como também predisposição genética, sexo feminino e baixo peso corporal (ZHOU, *et al.*, 2019)

1.4 Mecanismos fisiopatológicos da discinesia induzida por L-DOPA

Os mecanismos pelos quais a L-DOPA causa a discinesia ainda não foram totalmente esclarecidos, por isso a necessidade de se investigar os fatores envolvidos na patogênese deste fenômeno. Muito embora, existam diversos mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados ao desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA, mudanças no circuito dos núcleos da base são o principal fator (JIMÉNEZ-URBIETA *et al.*, 2015). Evidências sugerem que a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra criam alterações na interação entre corpo estriado e o córtex motor, estabelecendo uma perturbação da

função dos núcleos da base que pode levar à geração de movimentos involuntários. Assim, a degeneração dos neurônios da substância negra é responsável pela alteração na função dos núcleos da base que leva a discinesia. A extensão dessa degeneração regula o nível e a duração da exposição a L-DOPA necessária para induzir a discinesia (JENNER, 2008).

A interrupção da liberação dopaminérgica pré-sináptica para o estriado devido à degeneração nigroestriatal é um pré-requisito para o desenvolvimento de LID, apesar de estudos mostrarem que macacos lesionados com MPTP e ratos lesionados com 6-OHDA no corpo estriado sem o tratamento com L-DOPA não desenvolvem discinesia, mostrando que a extensão da lesão é importante, porém outros fatores também estão envolvidos (HOUT *et al.*, 2013). Estudos realizados com animais não parkinsonianos demonstraram desenvolvimento de discinesia após a administração de altas doses de L-DOPA/benserazida, tornando inconclusiva a teoria da participação da degeneração dos neurônios estriatais com o desenvolvimento da discinesia (HUOT, 2015). A estimulação pulsátil dos receptores de dopamina e a alteração de neurotransmissores não-dopaminérgicos contribuem simultaneamente para o desenvolvimento de LID por meio da plasticidade no estriado, córtex e suas conexões. Imagens de ressonância magnética estrutural e funcional constataram que o volume do cortex pré-frontal aumentado e sua conectividade alterada com o putâmen estão associados à condição. A modulação dopaminérgica alterada na conectividade entre o putâmen e as áreas motoras foi considerada uma possibilidade substrato e preditor para o desenvolvimento de LID (YOO, *et al.*, 2019)

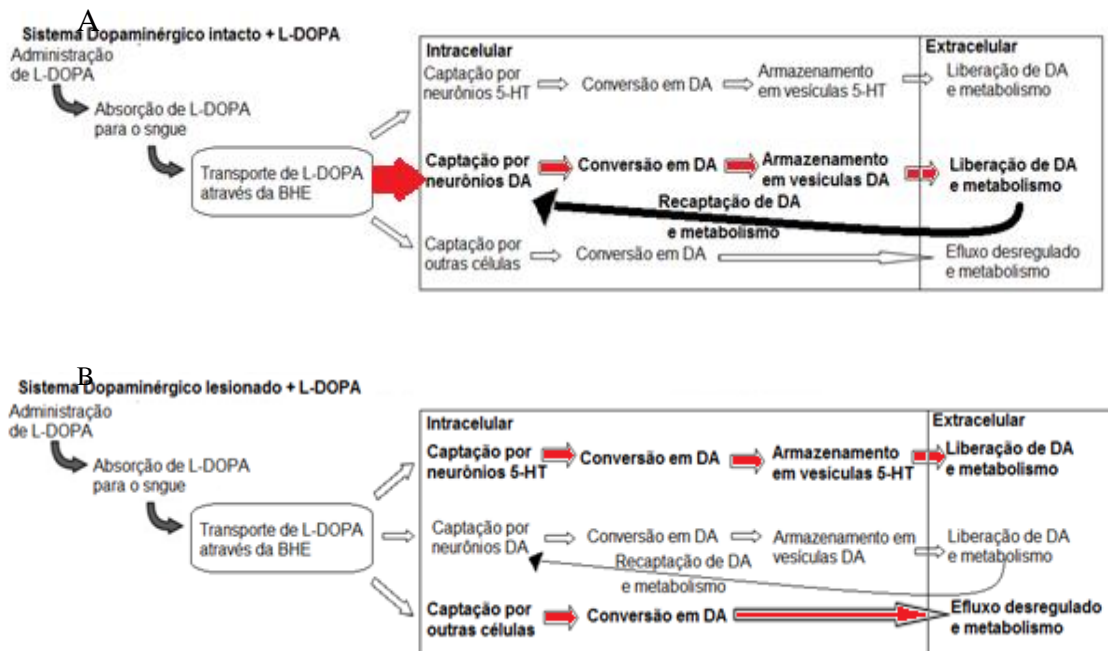
Os principais mecanismos da discinesia incluem a progressão da degeneração nigroestriatal, resultando na redução da capacidade de estocar a dopamina nas vesículas pré-sinápticas e liberá-la fisiologicamente, o aumento da conversão de L-DOPA em dopamina e a liberação aberrante de outros neurotransmissores pelos neurônios serotoninérgicos, alterações de receptores dopaminérgicos, que levam a mudanças sinápticas, incluindo a hipersensibilidade à dopamina devido à perda de projeções nigroestriatais, dessensibilização e diminuição dos receptores da superfície celular por devido a presença não fisiológica de altas doses de dopamina e o aumento da atividade glutamatérgica no corpo estriado (MAGRINELLI *et al.*, 2016).

Após a administração da L-DOPA, a dopamina produzida fica armazenada em vesículas pelos neurônios dopaminérgicos remanescentes e que a liberam ao longo de várias horas, permitindo um prolongamento da resposta terapêutica (DHALL; KREITZMAN, 2016). A resposta do tratamento vai mudando de acordo com a gravidade da doença, em pacientes que

já estão com a DP mais severo há uma redução da capacidade de armazenamento de dopamina, com isso, existe a necessidade do aumento da frequência das doses ao longo do tratamento causando uma liberação intermitente e pulsada de dopamina no corpo estriado, levando às alterações pós sinápticas de receptores (BRAVO, *et al.*, 2019)

O armazenamento e liberação de DA no cérebro do indivíduo com DP estão alterados (Figura 3). No sistema dopaminérgico intacto, a L-DOPA é captada principalmente por neurônios dopaminérgicos, onde é convertida em DA. A DA é então armazenada em vesículas através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) e liberada em resposta a um estímulo na fenda sináptica. O transportador de dopamina (DAT) tem a função de remover a DA remanescente na fenda, mecanismo eficiente de recaptção de DA na membrana pré-sináptica de neurônios dopaminérgicos. À medida que a DP progride, a L-DOPA é captada não só por neurônios dopaminérgicos remanescentes, mas por outros neurônios que são capazes de converter a L-DOPA e DA, principalmente neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe, além de outras células, contribuindo assim para a liberação intermitente da DA no corpo estriado (CENCI; LUNDBLAD, 2006). A importância dessa rota da DA em modelos animais de lesão por 6-OHDA é ainda mais pronunciada (MAEDA *et al.*, 2005).

Figura 3 Rotas da dopamina (DA) no sistema dopaminérgico intacto (A) e lesionado na DP (B).

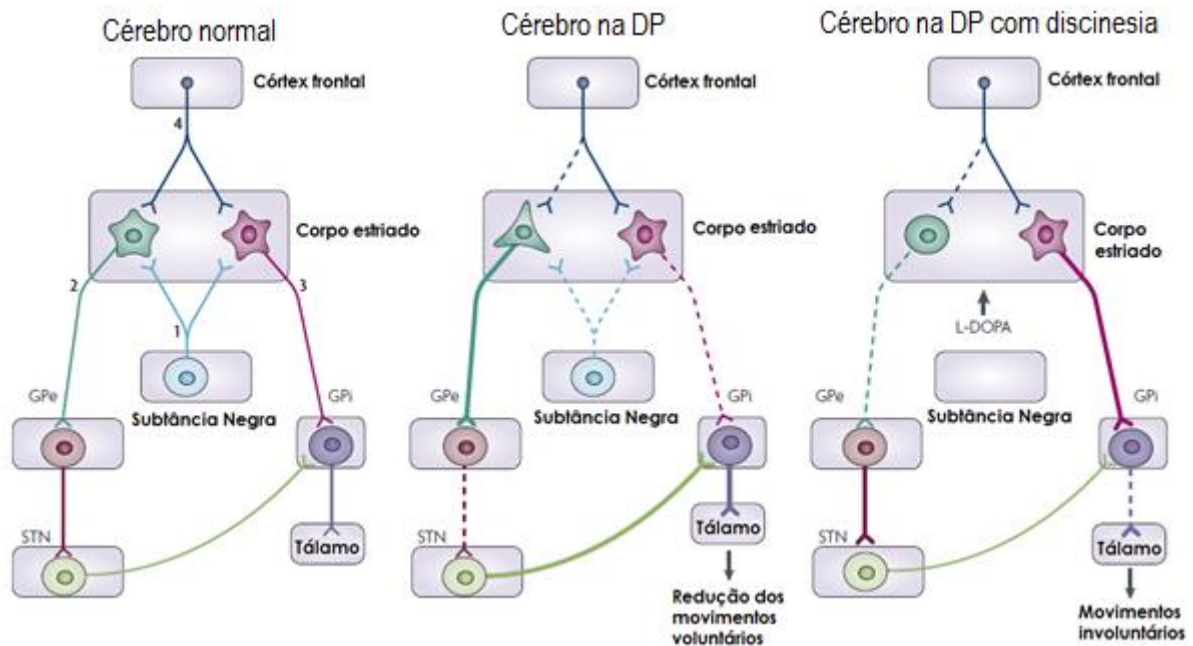


Adaptado de CENCI; LUNDBLAD, 2006.

Os núcleos da base são formados pela substância negra, corpo estriado (regiões caudato e putâmem), segmentos interno (GPi) e externo (GPe) do globo pálido e núcleo subtalâmico (STN) (Figura 4). De acordo com a organização clássica dos núcleos da base, o córtex cerebral envia projeções excitatórias glutamatérgicas para o corpo estriado. Essa via é modulada por projeções advindas da substância negra *pars compacta*, chamada de via nigroestriatal. Esta via lança dopamina no corpo estriado, podendo ser excitatória, relacionada aos receptores D1, através da via direta, ou ainda inibitória, relacionada aos receptores D2, através da via indireta. A via direta consiste em projeções gabaérgicas, advindas do corpo estriado, em direção ao GPi e substância negra *pars reticulada*, que também emitem fibras gabaérgicas às regiões ventrolateral e ventroanterior do tálamo. Na via indireta neurônios estriatais lançam projeções gabaérgicas para o GPe, que por sua vez, lança projeções gabaérgicas para o STN. O STN, então, envia projeções glutamatérgicas para o GPi e para a substância negra *pars reticulada* fechando assim o circuito (JENNER, 2008; HOUT *et al.*, 2013; MAGRINELLI *et al.*, 2016).

No modelo clássico da fisiopatologia da DP ocorre uma perda da projeção dopaminérgica advinda da substância negra levando a uma hiperatividade da via indireta e diminuição da atividade da via direta, assim como as projeções advindas do córtex para o corpo estriado também estão alteradas (Figura 3) (JENNER, 2008; 2013).

Figura 4 Desenho esquemático representativo da organização clássica dos circuitos dos núcleos da base no cérebro normal, de indivíduos com DP e discinesia



Conexões no cérebro normal: (1) Projeções dopaminérgicas oriundas da substância negra no mesencéfalo para o corpo estriado. (2) Projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o GPe através da via indireta. (3) projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o GPi através da via direta. (4) Projeções glutamatérgicas excitatórias advindas do córtex frontal. Adaptado de JENNER, 2008.

Em circunstâncias fisiológicas normais a DA é liberada pelos neurônios da via nigroestriatal estimulando os receptores D1 pela via direta e os receptores D2 pela via indireta. A ativação de receptores D1 e D2 tem efeitos opostos, visto que os receptores D1 estão acoplados a proteína $G\alpha_s$ que ativa adenilil ciclase levando a aumento de AMPc, enquanto que os receptores D2 estão acoplados à proteína $G\alpha_i$, que inibe a adenilil ciclase reduzindo AMPc citoplasmático (STOOF; KEBABIAN, 1981; ZHUANG *et al.*, 2000; CORVOL *et al.*, 2001). O AMPc regula a fosfoquinase A (PKA) que inicia a imediata expressão de genes. Quando os receptores D1 e D2 são co-estimulados ocorre à dissociação do receptor D1 da proteína $G\alpha_s$, se ligando então a proteína $G\alpha_q$ que ativa a fosfolipase C, formado inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), levando ao aumento de cálcio intracelular a partir do retículo endoplasmático (HEUMANN *et al.*, 2014).

Apesar de ainda não estar claro o mecanismo preciso de como a discinesia induzida por L-DOPA se desenvolve, sabe-se que modulações pré e pós-sinápticas no corpo estriado estão envolvidas. Estudos mostram que a inativação completa de receptores D1 bloqueia o

desenvolvimento de discinesia através do bloqueio da fosforilação de proteínas de sinalização extracelular reguladas por quinases (ERK), de FosB e de expressão de dinorfina. Enquanto que o receptor D2 parece apenas modular o processo (HEUMANN *et al.*, 2014). Um dos mecanismos pós-sinápticos está relacionado ao aumento de DA e glutamato no corpo estriado que levam a aumento da atividade das cascatas de sinalização. No corpo estriado normal o receptor D1, a partir do AMPc, ativa PKA que leva a fosforilação de substratos como a fosfoproteína neuronal regulada por dopamina e AMPc, a DARPP-32 (BUCK & FERGER, 2009; PICCONI *et al.*, 2003; ROBELET *et al.*, 2004; SANTINI *et al.*, 2007). Na discinesia parece haver uma superativação dessa cascata no corpo estriado com depleção de dopamina, fenômeno chamado de hipersensibilização. Evidências sugerem que esse fenômeno está ligado ao desenvolvimento de sintomas discinéticos correlacionados com o aumento da expressão de FosB em camundongos e ratos (PAVON *et al.*, 2006).

O envolvimento de fatores de transcrição como o CREB parece estar relacionado à fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA. Foi demonstrado que ratos lesionados com 6-OHDA que receberam uma injeção intraestriatal de códon antisense de CREB, que desativa o CREB, obtiveram AIMs (*abnormal involuntary movements – AIMs*) mais severos após uma administração aguda de L-DOPA (ANDERSSON *et al.*, 2001) sugerindo que o CREB esteja mais envolvido ao efeito anti-discinético. O envolvimento do transportador de dopamina (DAT) também já está bem estabelecido. Uma redução de cerca de 50% do DAT é capaz de promover discinesia em primatas não humanos lesionados com MPTP (DI MONTE *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado através da análise proteômica, diversas proteínas com níveis de expressão alterados em animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA. Mais de 70 proteínas apresentaram diferenças significativas em suas expressões temporal e espacial entre os grupos 6-OHDA e controles, principalmente proteínas mitocondriais (PARK *et al.*, 2010) e sinápticas (XIONG *et al.*, 2014).

Embora o sistema dopaminérgico desempenhe um papel fundamental na patogênese, várias modulações não dopaminérgicas foram associadas à discinesia. Atualmente essas vias não dopaminérgicas são alvos de uma série de drogas em desenvolvimento como, por exemplo, alterações na transmissão serotoninérgica, alteração no sistema colinérgico, opióide, adrenérgico e canabinóide, disfunção de sinalização intracelular, alteração na atividade de canais de cálcio, alteração na expressão de genes e alteração na plasticidade neuronal (MCFARTHING, *et al.*, 2019; JENNER, 2011)

Projeções glutamatérgicas oriundas do córtex motor direcionadas ao corpo estriado estão alteradas nos modelos animais de DP e de discinesia induzida por L-DOPA. Através da ativação de receptores NMDA e AMPA, o glutamato media a comunicação do córtex com os núcleos da base no circuito motor (CENCI; LUNDBLAD, 2006). Por 25 anos, modelos de DP e LID postularam que o glutamato patologicamente diminuído promove sintomas de DP, enquanto o glutamato patologicamente aumentado promove sintomas de LID (ALEXANDER *et al.*, 1990; CENCI, 2007). Estudos mais recentes mostram que não há relação dos AIM's e o efluxo de glutamato, porém o glutamato pode funcionar como um modulador, tendo como base trabalhos que utilizaram antagonistas AMPA que diminuíram a LID (LINDENBACH, *et al.*, 2016) e também outras evidências de que o antagonismo combinado de AMPA e NMDA produzem uma supressão da LID mais poderosa do que pode ser alcançada com o bloqueio de qualquer receptor sozinho (BIBBIANI *et al.*, 2005) A amantadina é um medicamento antidiscinético eficaz e único disponível no mercado, atuando amplamente pela inibição da hiperatividade glutaminérgica, embora também afete outros sistemas (MCFARTHING, *et al.*, 2019). A memantina, outro antagonista de receptor NMDA, que também demonstrou efeito anti-discinético em ratos lesionados por 6-OHDA que receberam tratamento com L-DOPA (TRONCI *et al.*, 2014) também já está em fase de estudos clínicos e têm demonstrado efeito anti-discinético em humanos (WICTORIN, *et al.*, 2016).

A disfunção serotoninérgica está associada a sintomas e complicações não motoras, incluindo ansiedade, depressão, demência e distúrbios do sono. Essa patologia reduz a qualidade de vida do paciente e a interação entre os sistemas serotoninérgicos e outros neurotransmissores, como dopamina, noradrenalina, glutamato e GABA, controla a atividade dos neurônios do estriado e é particularmente interessante para a compreensão da fisiopatologia da DP. Além disso, a disfunção serotoninérgica também causa sintomas motores (MUÑOZ, *et al.*, 2020). Existem evidências de que a integridade dos neurônios serotoninérgicos seja um fator crítico no desenvolvimento da LID, uma vez que a modulação das projeções serotoninérgicas e sua atividade usando agonistas de receptores da serotonina resultem na melhora da LID (FARAJDOKHT, *et al.*, 2020). Os neurônios serotoninérgicos, que permanecem intactos no início do curso da doença, participam da transformação da L-DOPA exógena em DA, do seu armazenamento e da sua liberação (CARTA *et al.*, 2007; TRONCI E CARTA, 2013). A DA produzida é co-armazenada com serotonina em terminais serotoninérgicos como um falso neurotransmissor e co-liberado por meio de um processo conhecido como co-transmissão compensatória (MAHMOUDI, *et al.*, 2013). No entanto, a falta de mecanismos

autorregulatórios existentes nos neurônios dopaminérgicos, como o transportador de dopamina (DAT) e os receptores inibidores D2 em neurônios serotonérgicos, levam à liberação aberrante de DA no estriado, manifestando-se como LIDs (MAHMOUDI, *et al.*, 2011). O tratamento crônico com L-DOPA diminui a densidade das fibras nervosas 5-HT do estriado na ausência de neurônios dopaminérgicos (NEVALAINEN, *et al.*, 2014). Na verdade, a longo prazo a exposição ao L-DOPA pode exercer efeitos tóxicos (como a produção de 6-OHDA) nas células serotonérgicas após sua absorção, levando à redução da concentração de 5-HT nas áreas estriatal e extrastriatal, deteriorando ainda mais a discinesia em pacientes com DP tratados com L-DOPA (BORAH E MOHANAKUMAR, 2012; ESKOW JAUNARAJIS *et al.*, 2012). O tratamento com L-DOPA a longo prazo, também podem aumentar os níveis de homocisteína que causam estresse oxidativo e excitotoxicidade. A ativação dessas vias aberrantes destroem os neurônios serotonérgicos, levando a níveis reduzidos de 5-HT e supersensibilidade do receptor 5-HT1A após o tratamento com L-DOPA. Após uma diminuição da atividade serotonérgica, a concentração de dopamina diminui em várias regiões do cérebro inervadas por neurônios 5-HT (LUNDBLAD *et al.*, 2009; MÜLLER, 2002; NAVAILLES *et al.*, 2011). Todos esses mecanismos seriam finalmente acompanhados pela deterioração das LIDs, indicando o papel vital do sistema serotonérgico na patogênese da discinesia.

1.4.1 Neuroinflamação na DP e LID

A neuroinflamação no SNC é uma resposta coletiva das células do encéfalo contra insultos diversos (invasores patógenos, traumatismos, proteínas agregadas ou modificadas, acidente vascular cerebral, etc.) projetados para remover ou inativar agentes nocivos e para inibir e/ou reverter seus efeitos prejudiciais (TÓTH, *et al.*, 2019). É caracterizada por três processos principais: 1. Ativação de células gliais residentes, 2. Liberação de citocinas e quimiocinas e 3. Recrutamento e infiltração de células sanguíneas da periferia para o parênquima cerebral (SAAVEDRA-LOPEZ, *et al.*, 2017). A neurodegeneração pode gerar uma resposta inflamatória no parênquima, e esta reação pode também induzir degeneração neural adicional (TÓTH, *et al.*, 2019). Barnum e colaboradores (2008) demonstraram que a administração exógena de corticosterona reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em ratos parkinsonianos.

Vários estudos experimentais têm investigado o papel das alterações inflamatórias na DP em maior detalhe utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Inicialmente, as toxinas que destroem diretamente os neurônios dopaminérgicos, como a 6-OHDA, MPTP e rotenona, foram demonstradas como capazes de ativar as células gliais e induzir alterações inflamatórias na

via nigroestriatal. Esses trabalhos demonstraram que a perda neuronal dopaminérgica pode ocorrer como consequência direta da ativação microglial, que é acompanhada por aumento da formação de citocinas, maior produção de oxigênio reativo (ROS) e espécies de nitrogênio e diminuição da secreção de fatores tróficos responsáveis pela manutenção normal da viabilidade neuronal (HUNOT, *et al.*, 2009).

As células microgliais são consideradas os macrófagos do SNC que quando ativadas através de um dano sofrem alterações morfológicas e bioquímicas. Além da micróglia, outras células presentes na neuroinflamação são os astrócitos que tem como principal função eliminar as espécies reativas de oxigênio liberadas pelos neurônios, evitar a excitotoxicidade do glutamato aumentando a taxa de captação e conseqüente inativação desse neurotransmissor e também podem responder a estímulos patogênicos através de fatores inflamatórios como as citocinas

Embora a ênfase no papel da glia tenha se centrado na micróglia ativada, deve-se ter em mente que a astrocitose também ocorre na DP e pode desempenhar um papel significativo na seqüência de eventos que levam à morte celular. A astroglia, ao contrário da micróglia, é conhecida por desempenhar um papel central na defesa antioxidante do encéfalo e exercer uma variedade de funções neuroprotetoras. Os astrócitos eliminam ROS liberadas pelos neurônios, evitam a excitotoxicidade do glutamato, aumentando a taxa de captação e conseqüente inativação desse neurotransmissor, produzem fatores que induzem enzimas antioxidantes (SAAVEDRA-LOPEZ, *et al.*, 2017), e regulam o crescimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios, como parte das interações bidirecionais neurônio-glia. Os astrócitos também são capazes de responder a estímulos patogênicos através da liberação de fatores inflamatórios, como citocinas (KITA, *et al.*, 2019). Apesar de todas estas funções, o papel dos astrócitos e da micróglia na DP ainda não está bem determinado. BORTOLANZA e colaboradores (2015) demonstraram que a astrogliose e a micriogliose estão aumentadas em ratos hemi-parkinsonianos lesionados com 6-OHDA após a administração de L-DOPA/benserazida.

A cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima que possui ação ampla no quadro de neuroinflamação na DP. Quando há a neuroinflamação característica da doença, essa enzima pode ser rapidamente sintetizada, podendo ser considerada uma das responsáveis pela degeneração neural da DP (PISANU, *et al.*, 2018). Em 2016, BORTOLANZA mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA foi capaz de aumentar a expressão de células COX-2 positivas aumentando o ambiente pró-inflamatório já existente, juntamente ao aumento de células gliais no estriado lesionado, micróglia e astrócitos a COX-2 é constitutivamente expressa em diversos

neurônios e pode ser expressa na maior parte dos neurônios após uma variedade de insultos (FIEBCH, *et al.*, 2014). Apesar destes achados, ainda não existem estudos clínicos demonstrando a participação da neuroinflamação no processo fisiopatológico da discinesia, apesar deste mecanismo já estar bem estabelecido na fisiopatologia da DP em si. Mais estudos ainda são necessários para que se comprove esta participação e baseados nisso, ainda não é possível afirmar se o surgimento da COX-2 no estriado de modelos experimentais está necessariamente envolvido com um processo neuroinflamatório e envolve a produção de outros fatores, como citocinas. E, principalmente, se seu surgimento está envolvido com a manifestação da LID ou, ao contrário, seria uma resultante da manifestação crônica desta patologia.

Nossa hipótese é de que a LID, como processo neuroquímico, depende da ativação de cascatas inflamatórias, como a ativação do fator de transcrição NF- κ B e da enzima COX-2 para que ocorra e que devido a isso, o uso dos antagonistas dos receptores P2Y1, podem ser uma ferramenta terapêutica para impedir ou atenuar a manifestação desta patologia. A caracterização mais aprofundada do processo inflamatório ocorrente no estriado lesionado de camundongos discinéticos e o envolvimento da enzima COX-2 se torna necessária para melhor compreender o papel dessa enzima na LID e se os antagonistas dos receptores purinérgicos podem constituir um bom método para o tratamento da mesma. Dessa forma, o presente trabalho deseja caracterizar o papel da neuroinflamação na LID, focando principalmente na enzima COX-2, micróglia e astrócitos.

1.5 Modelos experimentais de DP e de discinesia induzida por L-DOPA em animais

Os modelos experimentais com uso de animais tem contribuído muito para o conhecimento dos mecanismos fisiopatológicos das doenças, além de nos permitir a formulação de várias hipóteses para explicar o processo neurodegenerativo do sistema nervoso central, possibilitando a pesquisa por novos agentes terapêuticos que serão úteis na terapia da DP e discinesia.

Assim, foram desenvolvidos modelos animais utilizando-se neurotoxinas dopaminérgicas e modelos de linhagens modificadas geneticamente direcionada a genes relevantes para a doença. Assim, foram introduzidos agentes que seletivamente lesam e destroem os sistemas catecolaminérgicos, tais como as toxinas MPTP e a 6-OHDA (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; FRANCARDO; CENCI, 2014). Além desses, alguns agentes químicos utilizados na agricultura como a rotenona e o paraquat, quando administrados sistemicamente, podem induzir algumas das características da DP, apesar de serem menos reproduzíveis (JAGMAG *et al.*, 2016).

Deve-se notar que a discinesia também pode ser induzida por outros agonistas da dopamina ou transplante de neurônios dopaminérgicos (Discinesia induzida por enxerto, GID), mas LID é o tipo mais clássico. Embora muito tenha sido aprendido sobre os fatores de risco de discinesia como a idade de início da DP, gravidade da doença, dosagem de L-DOPA e administração pulsátil, seus mecanismos moleculares exatos permanecem não resolvidos (PENG, *et al.*, 2019).

O modelo unilateral de rato com lesão por 6-OHDA é um modelo clássico para sintomas motores de DP que foi introduzido pela primeira vez na década de 1960, logo após a rotação involuntária induzida por drogas foi descrita neste modelo (PENG, *et al.*, 2019). A 6-OHDA é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da substância negra, tanto *in vitro* como *in vivo* (SCHOBER, 2004). Ela é incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNpc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente dos neurônios catecolaminérgicos. Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. Produz lesões na SNpc pela indução da produção de peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio, como radical hidroxil, e também pela inibição do complexo I mitocondrial (BLUM *et al.*, 2001).

Os ratos são animais com o melhor custo-benefício para estudar drogas neuroprotetoras no modelo de Doença de Parkinson. Assim como para avaliar a problemas motores relacionados à DP como a acinesia, e ao tratamento com L-DOPA, como a discinesia (FRANCARDO; CENCI, 2014; LUNDBLAD *et al.*, 2002). Para entender os mecanismos de discinesia induzidos por L-DOPA e os possíveis tratamentos. Existem dois modelos de movimentos involuntários que ocorrem na DP. O primeiro é a administração de L-DOPA em ratos lesionados com a neurotoxina 6-OHDA onde se observam os movimentos involuntários anormais (CENCI; OHLIN, 2009; BASTIDE *et al.*, 2015). O segundo é a administração de L-DOPA em primatas não-humanos tratados com MPTP que irão desenvolver movimentos do tipo coréia e distonia, semelhantes aos que ocorrem em pacientes com DP (JENNER, 2008)

O modelo utilizado no presente trabalho foi o de indução de AIMs através da administração crônica de L-DOPA em ratos *Wistar* albinos lesionados com 6-OHDA. Não existe um consenso geral de qual a melhor dose e via de administração na qual a L-DOPA seja capaz de induzir AIMs em ratos. Alguns autores utilizam a administração de L-DOPA via i.p. na dose de

4mg/kg ou na dose de 6 mg/kg (BARNUM *et al.*, 2009), outros autores administraram via s.c. a dose de 6 mg/kg (TRONCI *et al.*, 2013; CONTI *et al.*, 2014), e também via i.p. a dose de 20 mg/kg durante 10 dias (DOO *et al.*, 2014). O modelo que foi utilizado neste trabalho foi o mesmo utilizado por DEL-BEL e colaboradores (2014) no qual se administra por gavagem a L-DOPA na dose de 30 mg/kg associada a benserazida (7,5 mg/kg) uma vez ao dia durante 22 dia.

1.6 Receptores purinérgicos e LID

O ATP é a principal fonte de energia livre para os processos metabólicos das células. As primeiras evidências que mostraram que o ATP atua como um sinalizador intercelular foi com o trabalho de Drury e Szent-Gyorgyi em 1929 que descreveram o efeito vasodilatador e depressor cardíaco do ATP e da adenosina. Burnstock, em 1972 propôs, com base em evidências experimentais, que o ATP atua como um neurotransmissor, usando o termo “nervos purinérgicos”. A liberação do ATP ocorre através dos neurônios pre-sinápticos e também nos neurônios pós sinápticos. Hoje, sabe-se da presença dos receptores purinérgicos em diversos fenótipos não-neurais assim como nos mais diversos tecidos e sua sinalização está envolvida em muitos mecanismos, incluindo secreção endócrina e exócrina, resposta imune, dor, inflamação, agregação de plaquetas, vasodilatação, proliferação e diferenciação celular (BURNSTOCK, 2007). O ATP modula os disparos espontâneos nos neurônios da substância negra *pars compacta* possivelmente através desses receptores. As taxas de disparos espontâneos neuronais estão diretamente relacionadas aos níveis basais de Ca^{2+} e que o ATP aumenta a atividade de disparos nos neurônios dopaminérgicos mesmo em altas concentrações, como 1mM. Isso poderia levar a um elevado acúmulo de Ca^{2+} e causar toxicidade em certas condições como convulsões, hipóxia e isquemia, podendo ser mais deletério aos neurônios dopaminérgicos (CHOI *et al.*, 2009). Os receptores purinérgicos são divididos em receptores P1 e P2 que respondem seletivamente à adenosina e ao ATP, respectivamente. O ATP é degradado pelas ectonucleotidases formando a adenosina, com subsequente ativação dos receptores P1 que são subdivididos de acordo com evidências moleculares, bioquímicas e farmacológicas em quatro subtipos A1, A2a, A2b, e A3, todos acoplados à proteína G e tendo como funções no SNC a regulação do sono, ansiedade, memória e performance cognitiva (GIACOMELLI, *et al.*, 2018).

Os receptores do tipo P2 podem ser separados farmacologicamente em dois subtipos: os receptores P2X e os receptores P2Y. Enquanto os receptores P2X são canais de íons controlados por ligante permeáveis para Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , os receptores P2Y são acoplados às proteínas G e ativam diferentes cascatas intracelulares.

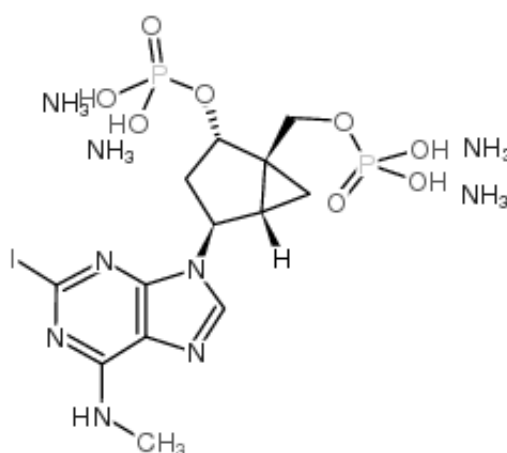
Oito receptores P2Y diferentes (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y 11, P2Y12, P2Y13 e P2Y14) foram identificados exibindo uma sensibilidade diferente a ATP (P2Y11), ADP (P2Y1, P2Y12 e P2Y 13), UTP / ATP (P2Y2 e P2Y4), UDP (P2Y6) ou UDP-glicose (P2Y14). Os receptores P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6 e P2Y11 são acoplados às proteínas Gq, cuja ativação estimula a fosfolipase C e a liberação subsequente de Ca^{2+} das reservas intracelulares e a ativação da proteína quinase C em resposta ao IP3 e produção de DAG, respectivamente. O receptor P2Y11 também pode se acoplar a Gs estimulando a adenilato ciclase e aumentando a geração de AMPc. Os receptores P2Y12–14 se acoplam ao Gi, inibindo efetivamente a adenilato ciclase e diminuindo a produção de AMPc (GUZMAN, *et al.*, 2016).

Os receptores P2Y são expressos em praticamente toda a parte do corpo, incluindo o sistema nervoso central onde estão localizados em neurônios, astrócitos, oligodendrócitos e microglia com papéis fisiológicos na neurotransmissão, neurogênese e comunicação das células gliais, embora também estejam envolvidos em uma série de processos fisiopatológicos periféricos, incluindo inflamação, isquemia e dor (FÖRSTER, *et al.*, 2015). Estudos mostraram que o receptor P2Y1 é ativado por ADP que induz a agregação plaquetária sendo um alvo para drogas antitrombóticas (FRIES, *et al.*, 2004), também medeia a ativação da microglia após lesões cerebrais e insulto (KITA, *et al.*, 2019). Há relatos de sobre-regulação do receptor P2Y1 no SNC sob condições patológicas, como lesão mecânica, isquemia e neurodegeneração (FÖRSTER, *et al.*, 2015). Além disso, a hiperatividade dos receptores P2Y1 foi detectada em modelos animais de doença de Alzheimer e aumento da expressão do receptor foi observado no hipocampo e córtex do cérebro pós-morte seções em pacientes com Alzheimer (JIRILLO, *et al.*, 2012). A inibição do receptor P2Y1 também mostrou reduzir o déficit de cognição resultante de AVC (HARADA, *et al.*, 2011). Assim, estudar os efeitos de um antagonista seletivo de receptor P2Y1, o MRS2500, se torna importante para entender qual o papel dos receptores purinérgicos na fisiopatologia da discinesia.

O MRS2500, foi nossa ferramenta farmacológica para avaliar se o bloqueio dos receptores P2Y1 protege contra o desenvolvimento da discinesia, com o nome químico [2-iodo-N6-metil- (N) metanocarpa-2'-desoxiadenosina-3 ', 5'-bifosfato] (Figura 5), este composto é um antagonista seletivo dos receptores P2Y1 altamente potente quando o comparamos com seus análogos de bisfosfatos de nucleotídeos, o MRS2298, MRS2496,

devido ao anel rígido metanocarba (biciclo-3,1,0-hexano), resultando em uma conformação de maior afinidade pelo receptor. Além disso, este grupamento pode substituir a ribose aumentando a estabilidade da molécula em relação às ectonucleotidasas. O MRS2500 exibe elevada potência inibitória do receptor P2Y₁ e estabilidade *in vivo*. (HECHLER, 2006

Figura 5 Estrutura molecular do MRS2500



Fonte: TOCRIS

Estudos mostraram que o MRS2500 é potente na inibição da agregação induzida por ADP de plaquetas humanas e de rato (BAURAND *et al.*, 2001; WALDO *et al.*, 2002; HOUSTON *et al.*, 2005). O MRS2500 também reduz a excitabilidade das células ciliadas de suporte coclear, aumentando o espaço extracelular (BABOLA, *et al.*, 2020). Ham e colaboradores em 2010 utilizaram o MRS2500 para reduzir a secreção de bicarbonato duodenal em ratos. Em um modelo de epilepsia, o MRS2500 foi utilizado para avaliar o envolvimento dos receptores P2Y₁ na neurodegeneração *in vivo* mediada por excitotoxicidade, mostrando-se eficaz nessa neuroproteção (SIMOES, *et al.*, 2018). O MRS2500 foi utilizado para avaliar o envolvimento dos receptores P2Y₁ na regulação da inflamação alérgica em camundongos, mostrando que o bloqueio desse receptor através da nossa droga em estudo, inibiu o recrutamento de leucócitos (AMISON *et al.*, 2015). Além de seu uso revelar um papel proeminente dos receptores P2Y na patologia da doença de

Alzheimer, incluindo a produção e eliminação de A β , neuroinflamação, função neuronal e fluxo sanguíneo cerebral (ERB. *et al.*, 2015)

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que atinge aproximadamente 1% da população mundial com idade acima de 65 anos. O número de casos da doença tem aumentado a cada ano devido ao envelhecimento da populacional. O tratamento atual é baseado na reposição dopaminérgica com o precursor L-DOPA e induz a importantes efeitos colaterais como a discinesia, que muitas vezes é mais incapacitante que a própria doença e que pode levar a interrupção do tratamento. Portanto, faz-se necessária a investigação dos mecanismos que levam a indução da discinesia relacionado ao uso crônico de L-DOPA em pacientes acometidos pela Doença de Parkinson para que possamos partir em busca de terapias de suporte que diminuam os efeitos adversos causados pelo tratamento e melhorem a qualidade de vida desses pacientes.

Estudar a relação dos receptores purinérgicos na fisiopatologia da discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA é muito importante, visto que, antagonistas purinérgicos têm sido estudados como novas terapias para a DP. Assim, torna-se extremamente relevante o estudo dos possíveis efeitos neuroprotetores do MRS2500, antagonista seletivo P2Y1, na discinesia induzida por L-DOPA. Tornando assim o receptor P2Y1 um possível alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, através do desenvolvimento de uma possível nova droga utilizada como monoterapia no controle dos sintomas motores e não-motores em pacientes com DP.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar o possível efeito neuroprotetor do antagonista seletivo do receptor P2Y1, o MRS2500, e a participação do receptor de purinas, P2Y1, sobre discinesia induzida por L-DOPA em ratos hemi-parkinsonianos.

3.2 Objetivos Específicos

Analisar se o MRS2500:

- Previne a indução dos movimentos involuntários anormais;
- Previne as alterações de coordenação motora;
- Previne a degeneração neuronal (TH);
- Previne alterações no transportador de dopamina (DAT);
- Previne a neuroinflamação:
 - Diminuindo a astrogliose (GFAP),
 - Diminuindo a microgliose (CD11-b),
 - Inibindo o aumento de COX-2.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da variedade *Wistar*, pesando entre 250 e 300g, idade aproximada de 51 dias, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos à temperatura de 25 °C em ciclos de 12 horas de claro/escuro e livre acesso a água e a comida. No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 90/2016.

4.2 Drogas

Foram utilizadas 6-OHDA (Sigma-Aldrich®-USA); L-DOPA/Benserazida (Roche®-Brasil); Ketamina 90 mg/mL (Vetanarcol®); Xilazina 10 mg/mL (Rompum®), MRS2500 (Tocris®).

4.3 Protocolo Experimental

Ao todo foram utilizados 70 animais divididos em 5 grupos (Tabela 1). O tratamento com L-DOPA foi realizado dissolvendo-se um comprimido dispersível do medicamento Prolopa® (Roche®-Brasil) contendo L-DOPA (100 mg) e benzerasida (25 mg) em 20 mL de água destilada (veículo), resultando em uma concentração de 0,005 g/mL. Cada animal recebeu 0,6 mL da solução a cada 100 g de peso corpóreo, resultando na dose de 30 mg/kg (PANDOVAN-NETO *et al.*, 2009). A L-DOPA foi administrada por via oral (gavagem), uma vez ao dia, durante 22 dias. Foi preparada uma solução de MRS2500 na concentração de 2nmol/μl dissolvido no veículo Fluido cérebro espinhal artificial (aCSF). O tratamento com o MRS2500 foi realizado por via intra cérebro ventricular (i.c.v), através da implantação de mini bombas de infusão de liberação contínua (CARMO,*et al.*, 2014)

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração da toxina 6-OHDA a fim de induzir a lesão estriatal. A seleção dos animais se deu através do teste rotacional com apomorfina 14 dias após a administração de 6-OHDA, onde apenas

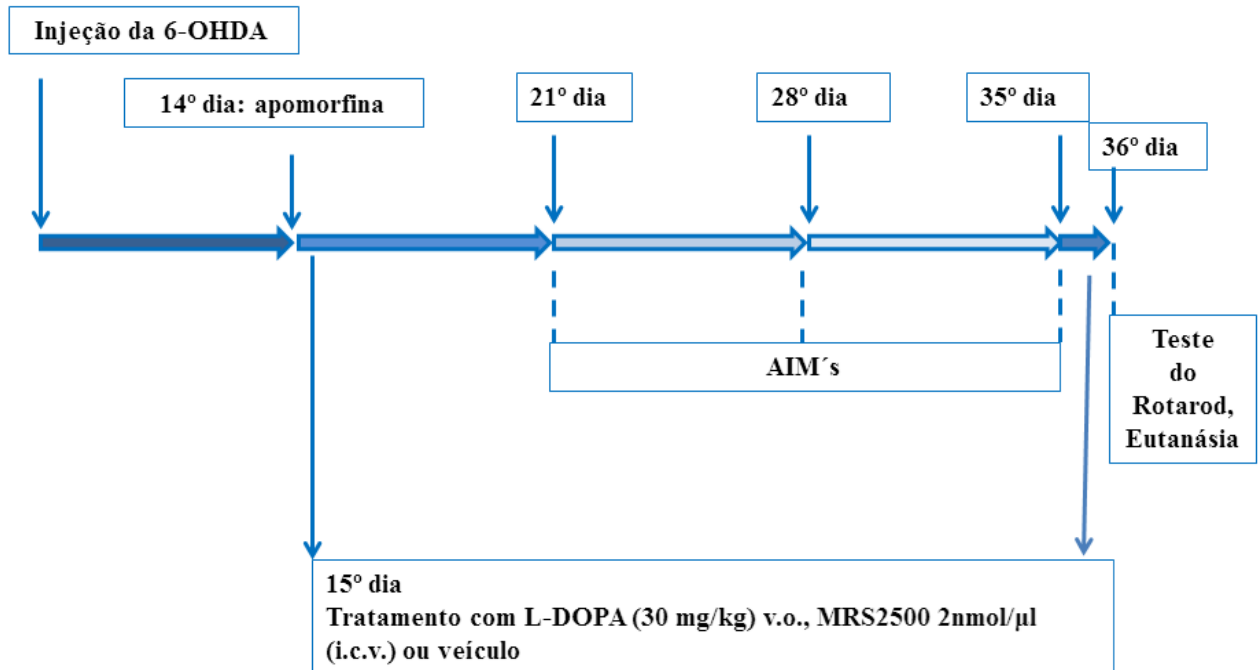
aqueles que obtiverem um número maior que 80 rotações foram selecionados para receber os tratamentos com L-DOPA e MRS2500 (Tabela 1)

Tabela 1 Protocolo de tratamento.

Grupos	Tratamento
FO	Veículo <u>intrastriatal</u> + veículo L-DOPA(v.o.) + <u>aCSF</u> (i.c.v.)
FO+MRS	Veículo <u>intrastriatal</u> + veículo L-DOPA (v.o.) + MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.)
PARK	6-OHDA (18 μ g/3 μ L <u>intrastriatal</u>) + veículo L-DOPA (v.o.) + <u>aCSF</u> (i.c.v.)
PARK + L-DOPA	6-OHDA (18 μ g/3 μ L <u>intrastriatal</u>) + L-DOPA 30mg/kg (v.o.) + <u>aCSF</u> (i.c.v.)
PARK + L-DOPA + MRS2500 2nmol/ μ l	6-OHDA (18 μ g/3 μ L <u>intrastriatal</u>) + L-DOPA 30mg/kg (v.o.) + MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.)

Os movimentos involuntários anormais (AIMs), que avaliam o desenvolvimento de discinesia, foram realizados nos dias 7, 14 e 21 após o início do tratamento com L-DOPA, que correspondem ao 21º, 28º e 35º dias após a cirurgia para injeção da 6-OHDA. O teste que avalia a alteração da coordenação motora (teste do rotarod) foi realizado no 36º dia após a cirurgia, que corresponde ao 22º dia após o início do tratamento com L-DOPA de acordo com o desenho experimental na figura 6. Após os AIMs e rotatod (n=14), cada grupo foi subdividido e os animais eutanasiados por decaptação, devido à necessidade de acesso ao tecido cerebral. Depois as áreas cerebrais correspondentes ao estriado direito e mesencéfalo foram dissecadas. Para a avaliação da degeneração neuronal e da neuroinflamação (TH, DAT, GFAP, CD11-b, COX-2) através de técnicas de histologia e imunohistoquímica com n=4 (Figura 6).

Figura 6 Desenho experimental



4.4 Técnica de implantação das bombas de infusão

Os sistemas de bombas micro-osmóticas podem ser usados para infusão de drogas a longo prazo. Isso garante um modo seguro e conveniente de entrega de droga dentro do cérebro de rato. A técnica para a implantação das mini bombas é dividida em duas etapas, sendo a primeira etapa a preparação das bombas (feita no dia anterior à cirurgia de implantação) e a segunda etapa a cirurgia para a implantação das mini bombas no animal (<https://www.jove.com/t/56410?language=Portuguese>)

As bombas utilizadas foram do modelo 1004, ALZET micro-osmotic pumps, onde este modelo bombeia 0,11 µL/hr durante 28 dias com o volume máximo de 100 µL. O preparo da bomba, do fluido cefalorraquidiano artificial (aCSF) e da droga (MRS2500 (2 nmol/µl em aCSF)) foram feitos sob condições estéreis e realizados todos os procedimentos em capela de fluxo laminar.

As bombas foram preenchidas com fluido cerebrospinal artificial (aCSF) para os animais sem tratamento e para os animais tratados enchemos as bombas com MRS2500 com uma seringa de 1 mL e agulha fornecido juntamente com o kit (as bombas foram preenchidas com aCSF e MRS2500 lentamente até o excesso vazar para evitar bolhas de ar no interior da bomba). Em seguida cortou-se os tubos de cateter com o comprimento de 5 com aproximadamente (de acordo com o tamanho do animal) e foi anexado ao kit de infusão de cérebro. O kit de infusão de cérebro para a bomba de micro-osmótica, foram armazenados em placas de petri estéreis e preenchidas com salina estéril e guardados em estufa até o dia seguinte.

A segunda etapa foi a cirurgia intra cérebro ventricular para a implantação das bombas preparadas no dia anterior. O ambiente cirúrgico foi todo desinfetado com 75% de etanol (todas as pessoas envolvidas no procedimento usaram luvas estéreis e um jaleco limpo). Os instrumentos cirúrgicos foram autoclavados e secos antes do uso e posteriormente esterilizado com etanol a 75%. Os animais foram pesados e anestesiados usando injeção intraperitoneal (IP) com xilazina/cetamina (cetamina 50mg/kg, xilazina 10 mg/kg). (O peso corporal de ratos inferior 24 g não é recomendado para cirurgia de implante de bomba osmótica). Em a cabeça do rato foi fixada no estereotáxico. Foi separado a camada mais externa da pele subcutânea com a ajuda de um par de pinças perto da região do pescoço para a implantação de conjunto bomba osmótica-cérebro fusão onde foi marcado o ponto de infusão usando como referência o atlas de Paxinos (PAXINOS;WATSON, 1084). Neste experimento, a agulha foi implantada na região do terceiro ventrículo (Bregma: lateral 0.0 mm, posterior 1,3 mm, ventral 5,7 mm). Foi feito um furo com uma broca odontológica na área marcada no crânio onde foi implantado o conjunto de bomba micro-osmótica contendo aCSF (como controle) ou drogas (MRS2500) sob a pele para trás a região do pescoço e inseriu-se a agulha no orifício perfurado para infundir a droga no cérebro do rato, no ventrículo. Fixou-se a agulha no lugar no crânio usando cola em gel (loctite) e esperamos 1-2 min até a cola secar. Em seguida, foi cortado a parte saliente no topo da agulha.

Foi utilizada a pomada Kollagenase para prevenir infecção, a pele foi grampeada para fechar o local da implantação das mini bombas. Os animais foram mantidos em observação a 37 ° C até se recuperarem da anestesia e do procedimento cirúrgico.

4.5 Lesão intraestriatal por 6-OHDA

O modelo experimental de lesão do corpo estriado foi proposto por Ungerstedt (1968). Os animais foram anestesiados com xilazina (10mg/kg via i.p.) e quetamina (90mg/kg via intramuscular) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). Os procedimentos de lesão do corpo estriado foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma. Três coordenadas de acesso ao corpo estriado foram marcadas de acordo com o atlas de PAXINOS; WATSON (1984).

Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo a entrada da seringa *Hamilton* com a 6-OHDA diretamente no corpo estriado. As lesões foram feitas unilateralmente, apenas no hemisfério direito dos animais. Os animais receberam três micro injeções de 6-OHDA na concentração de 6 µg/µL em cada sítio, perfazendo um total de 18 µg/3µL. Os sítios onde a lesão foi realizada situam-se nas coordenadas descritas na Tabela 2. Após as injeções, os animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 15x45 cm) e o local desinfetado com iodo povidine. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina 6-OHDA. Foi somente introduzida à agulha nas mesmas coordenadas estereotáxicas, seguido de infusão de salina estéril com ácido ascórbico a 0,02 % (veículo para 6-OHDA).

Tabela 2 Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA

Coordenadas estriatais	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Antero-posterior (A-P)	+0,5	-0,5	-0,9
Medio-lateral (M-L)	-2,5	-3,0	- 3,7
Dorso-ventral (D-V)	+ 5,0	+6,0	+ 6,5

Fonte: PAXINOS; WATSON, 1984.

4.6 Teste rotacional induzido por apomorfina

A apomorfina é uma substância agonista dopaminérgica capaz de induzir o aumento da função motora dos animais. Neste teste é utilizada para avaliação da lesão unilateral induzida pela 6-OHDA em ratos. A apomorfina induz o movimento rotacional para o lado contralateral a lesão causada pela injeção unilateral de 6-OHDA no corpo estriado. O teste consiste na observação do número de rotações contralaterais a lesão durante 60 minutos após a administração de 1 mg/kg i.p. de apomorfina (UNGERSTEDT, 1971).

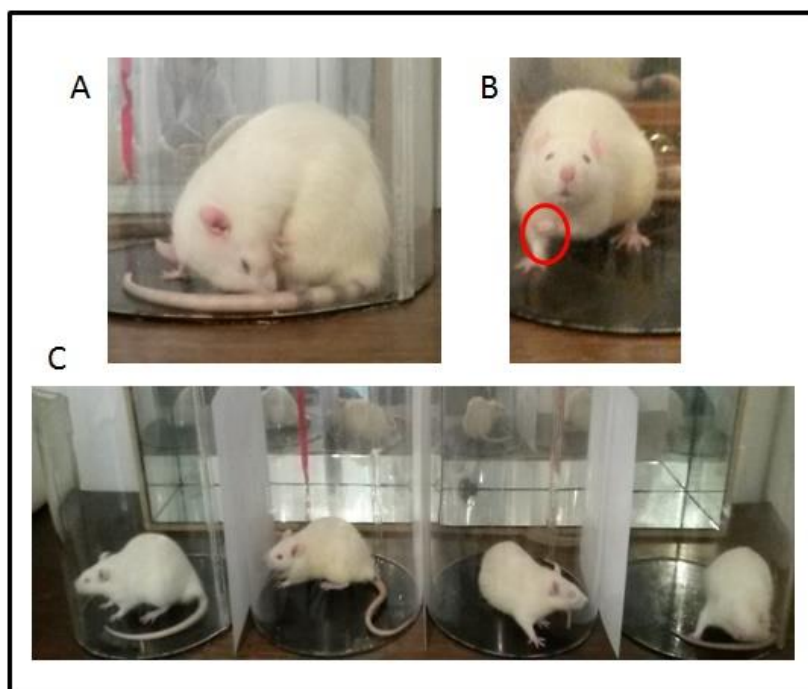
4.7 Movimentos involuntários anormais

Após o tratamento crônico com L-DOPA podem ser observados em roedores através da observação dos movimentos involuntários anormais (AIMs) que são expressos após tratamento com L-DOPA (LUNDBLAD *et al.*, 2002). Os animais foram observados nos dias 7, 14 e 21 após o início do tratamento com L-DOPA entre 9:00 e 16:00 h. Para quantificação dos AIMs, a L-DOPA foi administrada 30 minutos após a administração do MRS2500 e os animais foram observados 20 minutos após a administração da L-DOPA. Cada animal foi individualmente observado a cada 20 minutos entre 20 e 120 minutos após a

administração de L-DOPA. Cada observação teve a duração de 2 minutos. Os AIMs tendem a voltar para o basal após 140 minutos da administração de L-DOPA.

Os AIMs foram classificados em quatro subtipos: 1. AIMs axiais - postura distônica, torção coreiforme do pescoço, torção do corpo por cima do próprio eixo para o lado contralateral a lesão (Figura 7); 2. AIMs dos membros- movimento anormal e desproporcional dos membros anteriores e digito-pressão (Figura 7B destacado pelo círculo vermelho); 3. AIMs orolinguais - mastigação involuntária e protusão da língua contralateral a lesão; 4. AIMs locomotores- movimento circular com as quatro patas no chão contralateral a lesão (Figura 7 C). Cada um dos quatro subtipos recebeu um escore de acordo com uma escala de severidade de 0 a 4, sendo 0 sem movimento involuntário, 1 movimento presente em menos da metade do tempo de observação, 2 presente em mais da metade do tempo de observação, 3 presente em todo o tempo de observação, mas suprimido por estímulo sonoro, e 4 presente em todo o tempo de observação porém não suprimido por estímulo sonoro. O escore mínimo é 0 e o máximo 96. Os resultados são apresentados agrupando os subtipos axiais, de membros e orolinguais, designados pela sigla ALO AIMs, e separadamente os AIMs locomotores.

Figura 7 Subtipos de AIMs



Fonte: Arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento – NPDM – UFC.

4.8 Avaliação da coordenação motora - Teste de rotarod

Foi utilizado o equipamento rotarod (Figura 8), para avaliar a coordenação motora e alterações de equilíbrio no roedor. O protocolo utilizado foi descrito por PADOVAN-NETO e colaboradores (2009). Baseia-se na habilidade de roedores em manter o equilíbrio e a caminhada em um cilindro em rotação.

Figura 8 Aparelho de Rotarod



Fonte: Insight LTDA.

O protocolo utilizado consiste na avaliação dos déficits de coordenação motora induzidos por L-DOPA através da observação do desempenho no rotarod 1 e 2 h após a administração de L-DOPA em relação a um pré-teste realizado 30 minutos antes da administração de L-DOPA. O teste foi realizado no 37º dia após a injeção de 6-OHDA. O aparelho consiste de uma haste estriada (diâmetro: 3 cm) separados em quatro compartimentos (largura: 5 cm), com 20 cm de altura a partir de quatro pranchas de inclinação. Os animais foram treinados três dias antes da cirurgia em duas sessões. Cada

animal foi colocado sobre a haste rotativa em condições de aceleração 16-38 rpm durante 300 s em cada sessão. No dia do teste foi realizado o pré-teste 30 minutos antes da administração das drogas e foi registrado o tempo que o animal é capaz de andar sobre a haste (latência) antes de queda (tempo máximo: 300 s). Após a queda ou 300 s os animais foram removidos do aparelho e colocados em suas caixas para descanso. Após 30 minutos do descanso foi então administrado 30 mg/kg de L-DOPA v.o. Os animais retornaram para o aparelho 1 e 2 h após a administração de L-DOPA e então foi registrado a latência do animal antes de queda (tempo máximo: 300 s). O resultado foi expresso através do seguinte cálculo:

$$\left(\frac{\text{Média de latência (1 e 2 h)}}{\text{Latência pré-teste}} \right) \times 100$$

4.9 Análise imunohistoquímica

Os animais foram perfundidos através do coração, pelo ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 horas. Após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30%. O tecido foi cortado no criostato (Leica CM3050 S, Alemanha) e as fatias foram colocadas em placa de 24 poços e foram armazenados *free-floating* em PBS com azida sódica a 0,01% a 4°C até montagem e realização da imunohistoquímica

4.9.1 Imunomarcção para TH, DAT e COX-2

Para a realização da imunohistoquímica para Tirosina hidroxilase, transportador de dopamina e COX-2, as fatias da região estriatal e mesencefálica foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 0,3% (H₂O₂) durante 10 (dez) minutos e depois lavado mais 2 (duas) vezes por 5 (cinco) minutos em PBS. As fatias foram incubadas separadas para os anticorpos primários anti-TH (*mouse*, 1:800, SIGMA), anti-DAT (*goat*, 1:500, Santa Cruz), anti-COX2 (*goat*, 1:200, Santa Cruz) em albumina bovina 5% (BSA) durante a noite a 4°C. No outro dia as fatias foram então lavadas 3 vezes por 10

minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com os anticorpos secundários biotinizados diluído na solução de bloqueio *goat anti-mouse* IgG (1:200; Vector labs), *donkey anti-goat* (1:300, Vector Labs), respectivamente para TH, DAT e COX-2, por 2 horas a TA, e enxaguados novamente três vezes com PBS. O kit ABC (Vector Labs) foi utilizado por 40 minutos a temperatura ambiente para a amplificação do sinal, sendo a marcação revelada com 3,3'-diaminobenzidina (*DAB Peroxidase Substrate Kit*; Vector labs). A reação foi interrompida depois de 30 segundos, lavando-se as fatias em PBS antes de realizar a montagem em lâminas gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram desidratadas em gradiente de etanol e clarificadas com xileno, sendo finalmente cobertas com lamínulas utilizando-se o meio de montagem Eukitt (Fluka-Sigma). Os cortes foram visualizados no microscópio Zeiss Imager Z2 e a imunorreatividade para TH mensurada pela análise semi-quantitativa da densidade óptica utilizando-se o software Image J. Foi feita uma média para os valores obtidos para o grupo controle (FO) e todos os outros foram calculados como percentagem desse valor.

4.9.2 Imunofluorescência para GFAP, CD11-b

Para a realização da imunofluorescência para proteína ácida fibrilar da glia (GFAP), CD11-b e as fatias foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos. Em seguida foram bloqueadas com PBS contendo 5% de soro de cavalo durante 45 minutos. Depois se realizou a dupla marcação por 48 horas a 4°C com anticorpo anti-GFAP (*rabbit*, 1:1000, SIGMA) em combinação com anti-CD11b (*mouse*, 1:200, Serotec) diluídos em PBS com 0,25 % de Triton-X100 e 5% de soro de cavalo. Após os períodos de incubação as fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS com 0,25% de Triton-X100 e subsequentemente incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com os anticorpos secundários *donkey anti-rabbit* IgG conjugado com AlexaFluor 594 e *donkey anti-mouse* IgG conjugado com AlexaFluor 488(Life Tech) respectivamente para GFAP e CD11-b diluídos 1:500 em PBS com 0,25 % de Triton-X100 e 5% de soro de cavalo. Após lavar 3vezes em PBS por 5 minutos cada, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas com o meio de montagem fluorescente Dako (Dako, USA). Os cortes foram visualizados em microscópio confocal (Laser scanning, LSM 510 META, Zeiss).

A imunorreatividade para GFAP e CD11b foi quantificadas 4 fatias por animal (50 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e mesencéfalo. A

quantificação de Intensidade de Fluorescência (IF) utilizada para mensurar a imunorreatividade foi calculada através do programa Image J.

4.10 Análise estatística

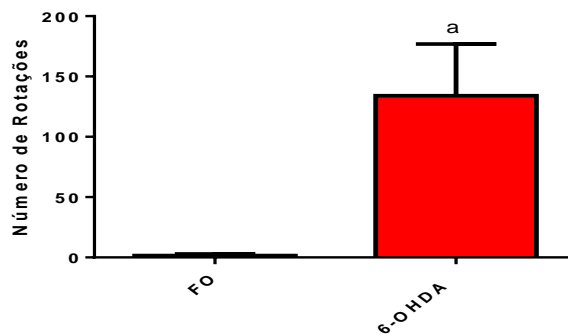
Os escores de AIMS foram avaliados através de testes não paramétricos, Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para a comparação dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste não paramétrico de medidas repetidas, teste de Friedman, seguido do teste de Dunn. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e os resultados foram expressos como mediana \pm Mínimo-Máximo. As análises imunohistológicas para TH, DAT foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey e os valores expressos como média \pm erro padrão da média. As análises imunohistoquímicas para GFAP e CD11b avaliadas através do teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e os resultados foram expressos como mediana \pm Mínimo-Máximo. A análise das células COX-2 positivas foi realizada através da ANOVA, seguida do teste de Tukey e os valores expressos como média \pm erro padrão da média. O critério de significância utilizado em todo o estudo foi de $p < 0,05$. O programa computacional de estatística usado foi o Graph PadPrism® 6.0.

5.RESULTADOS

5.1 Avaliação do número de rotações induzida pela apomorfina para seleção dos animais parkinsonianos

Os animais que receberam as injeções de 6-OHDA no corpo estriado apresentaram um aumento significativo do número de rotações induzidas pela administração de apomorfina (FO: $1,5 \pm 0,3$; 6-OHDA: $134,1 \pm 10,3$) (Figura 9).

Figura 9 Número de rotações induzidas pela apomorfina em ratos parkinsonianos



Os animais receberam a injeção intraestriatal de 6-OHDA ($18 \mu\text{g}/3 \mu\text{l}$) e após 14 dias foram tratados com apomorfina ($1,0 \text{ mg/kg i.p.}$) e observado o número de rotações apresentados pelos animais. Valores expressos em média \pm EPM. Teste *t* de Student. $p=0,0005$. ^avs FO (n=14).

5.2 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre o desenvolvimento de ALO AIMS após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos

Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo do número de escores de movimentos involuntários anormais axial, orolinguais e dos membros quando comparados aos animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com L-DOPA após 7 dias de tratamento (PARK: 4 (3,0-6,0) escores, PARK+L-DOPA: 6 (4,0-15,0) (Figura 10A). Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e com o MRS2500 apresentaram uma diminuição do número de escores de movimentos anormais involuntários, porém não foi estatisticamente significativa quando comparamos com os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA (PARK+L-DOPA+MRS2500: 5,5 (1,0-11,0) (Figura 10A)

No 14º dia de tratamento observamos que os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento do número de movimentos anormais involuntários anormais axial, orolinguais e dos membros quando comparamos com os animais parkinsonianos (PARK: 4,0 (3,0-7,0), PARK+L-DOPA: 6,0 (3,0-12,0) (Figura 10B). O grupo parkinsoniano tratado com L-DOPA e com MRS2500 apresentaram uma redução significativa dos ALO AIMS quando comparamos com os animais parkinsonianos que receberam apenas L-DOPA, mostrando assim uma diminuição na discinesia induzida por L-DOPA (PARK+L-DOPA+MRS2500: 4,0 (2,0-6,0)(Figura 10B)

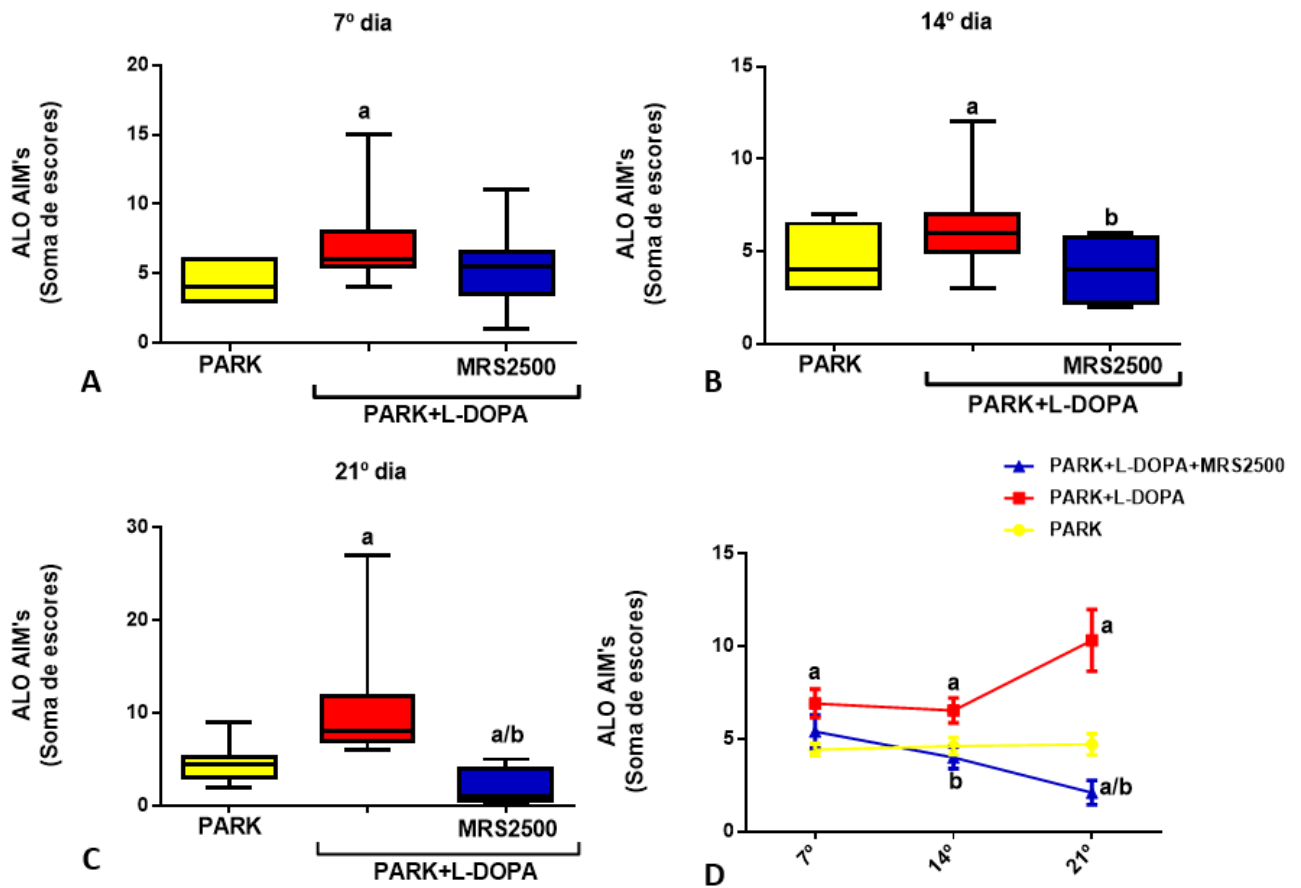
Após 21 dias de tratamento os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento do número de movimentos involuntários anormais axial, orolinguais e dos membros quando comparamos com os animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com L-DOPA (PARK: 4,5 (2,0-9,0), PARK+L-DOPA: 8,0 (6,0-27,0) e os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e MRS2500 conseguiram proteger contra o desenvolvimento da discinesia induzida pela L-DOPA, evidenciando assim, o efeito anti-discinético do MRS2500 (PARK +L-DOPA: 8,0 (6,0-17,0), PARK+L-DOPA+MRS2500: 1,0 (0,0-5,0) (Figura 10C)

O efeito do tratamento com L-DOPA na dose de 30 mg/kg foi avaliado através da comparação das médias de escores obtidos entre os dias 7, 14 e 21 de tratamento. O grupo parkinsoniano tratado com L-DOPA não apresentou aumento gradual significativo de ALO

AIMs ao longo do tratamento de 21 dias, apresentando efeito máximo a partir do 21º dia de tratamento (PARK + L-DOPA: dia 7: $6,90 \pm 0,78$; dia 14: $6,54 \pm 0,68$; dia 21: $10,33 \pm 1,65$) (Figura 10 D). O MRS2500 apresentou efeito anti-discinético a partir do 14º dia de tratamento (PARK + L-DOPA + MRS2500: dia 7: $5,4 \pm 0,90$; dia 14: $4,0 \pm 0,60$; dia 21: $2,1 \pm 0,65$). E no 21º dia os animais tratados com MRS2500 apresentaram um efeito anti-discinético melhor que os animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com L-DOPA (PARK: dia 7: $4,43 \pm 0,33$; dia 14: $4,61 \pm 0,46$; dia 21: $4,71 \pm 0,57$) (Figura 10 D).

Devemos salientar que os animais falso operados e os tratados com o MRS2500 não apresentaram ALO AIMS (7 dias: FO+V: 1,5 (0,0-2,0), FO+MRS2500: 2,0 (0,0-4,0), 14 dias: FO+V: 2,0(0,0-3,0), FO+MRS2500: 3,0 (1,0-5,0), 21 dias: FO+V: 1,5 (0,0- 5,0), FO+MRS2500: 2,5 (0,0-4,0). Os animais falso operados tratados com L-DOPA não apresentaram aumento significativo do número de ALO AIMS, o que demonstra que a L-DOPA por si só não é capaz de causar o desenvolvimento de movimentos involuntários anormais.

Figura 10 O MRS2500 impediu o desenvolvimento de ALO AIMs após 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos



Os animais parkinsonianos foram tratados 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e/ou com o MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) Em (D) observamos a curva de tempo dos escores de AIMs. Valores expressos em mediana (Min-Max). Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Valores expressos em mediana (Min-Max). $p < 0,05$. ^avs PARK, ^bvs PARK+L-DOPA

5.3 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre o desenvolvimento de AIMS locomotores após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.

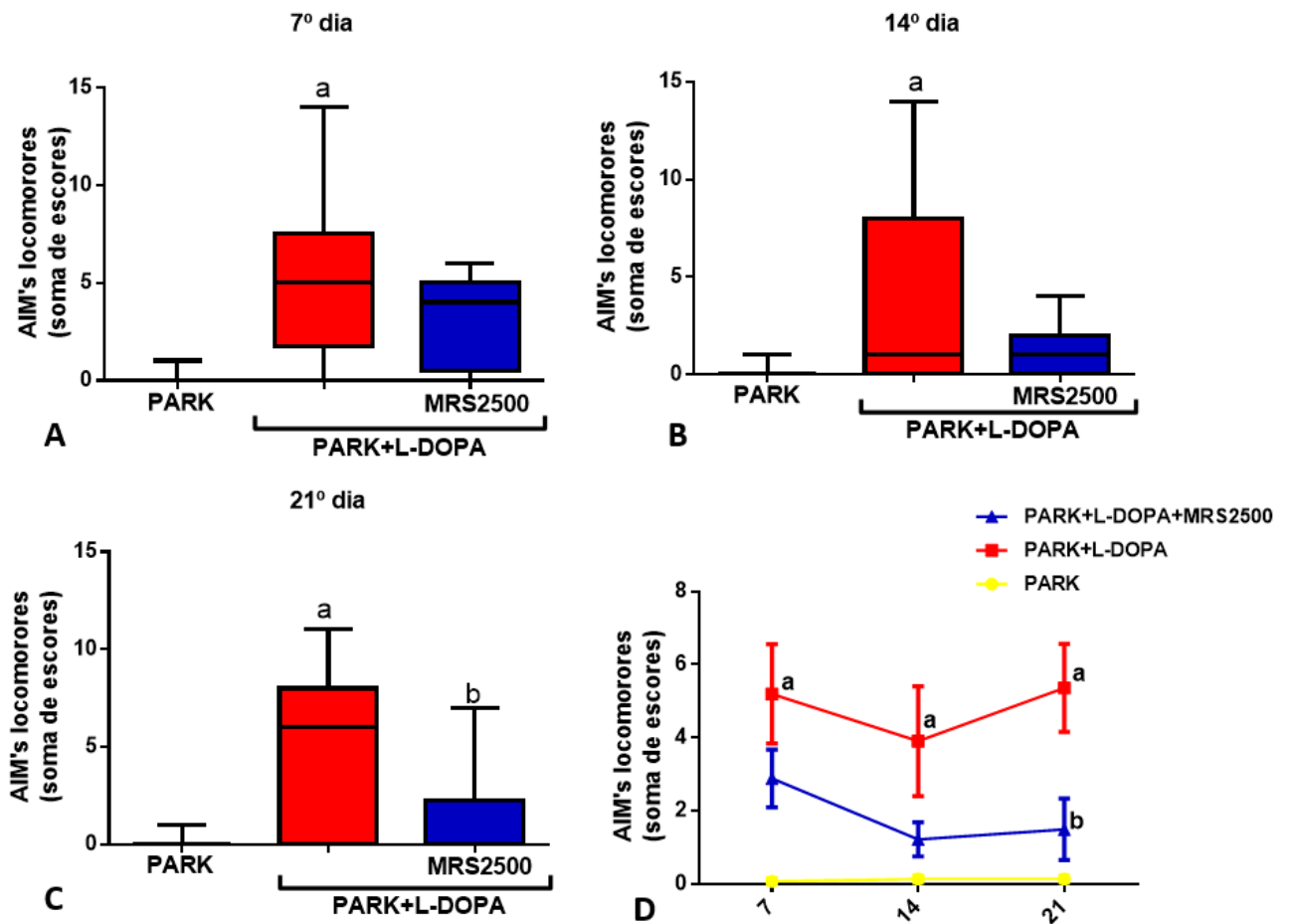
Após 7 dias de tratamento com L-DOPA os animais Parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo dos movimentos anormais involuntários do tipo locomotor quando comparamos com os animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com L-DOPA (PARK+L-DOPA: 5,0 (0,0-14,0) escores, PARK: 0,0 (0,0-1,0)), porém o grupo dos animais parkinsonianos que receberam o tratamento com L-DOPA e MRS2500 não apresentaram uma diminuição significativa dos AIMS locomotores (PARK+L-DOPA: 5,0 (0,0-14,0), (PARK+L-DOPA+MRS2500: 4,0 (0,0-6,0) (Figura 11A)

Após 14 dias de tratamento com L-DOPA os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo de alterações locomotoras em relação aos animais parkinsonianos (PARK+L-DOPA: 1,0 (0,0-14), PARK: 0,0 (0,0-1,0)), o tratamento com MRS2500 nesta segunda semana não foi capaz de proteger das alterações locomotoras quando comparamos com os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA (PARK+L-DOPA: 1,0 (0,0-14), PARK(1,0(0,0-4,0)) (Figura 11B).

Após 21 dias de tratamento observamos novamente o aumento das alterações locomotoras dos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA em relação aos animais parkinsonianos (PARK+L-DOPA: 6,0 (0,0-11,0), PARK: 0,0 (0,0-1,0)) e o tratamento com MRS2500 conseguiu proteger destas alterações diminuindo assim, os AIMS locomotores quando comparamos com os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA (PARK+L-DOPA+MRS2500: 0,0 (0,0-7,0)) (Figura 11C).

O grupo falso-operado tratado com L-DOPA (30mg/kg) não apresentou AIMS locomotores após 7, 14 e 21 dias de tratamento, mostrando que a L-DOPA sozinha, sem a degeneração dopaminérgica, não é capaz de induzir a discinesia. Não observamos alterações nos grupos falso operados (7 dias: FO: 0,0 (0,0-0,0), FO+MRS2500: 0,0 (0,0-1,0), 14 dias: FO:0,0(0,0-0,0) , FO+MRS2500: 0,0(0,0-0,0), 21 dias: FO: 0,0 (0,0-0,0), FO+MRS2500: 0,0 (0,0-1,0))

Figura 11 O MRS2500 impediu o desenvolvimento de AIMs locomotores após 14° e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos



Os animais parkinsonianos foram tratados 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e/ou com o MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.). Em (D) observamos a curva de tempo dos escores de AIMs. Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Valores expressos em mediana (Min-Max). $p < 0,05$. ^avs PARK, ^bvs PARK+L-DOPA

5.4 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre o desenvolvimento de AIMS Totais no 7^o, 14^o e 21^o dia após o início da administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos: curva de tempo após uma dose de L-DOPA.

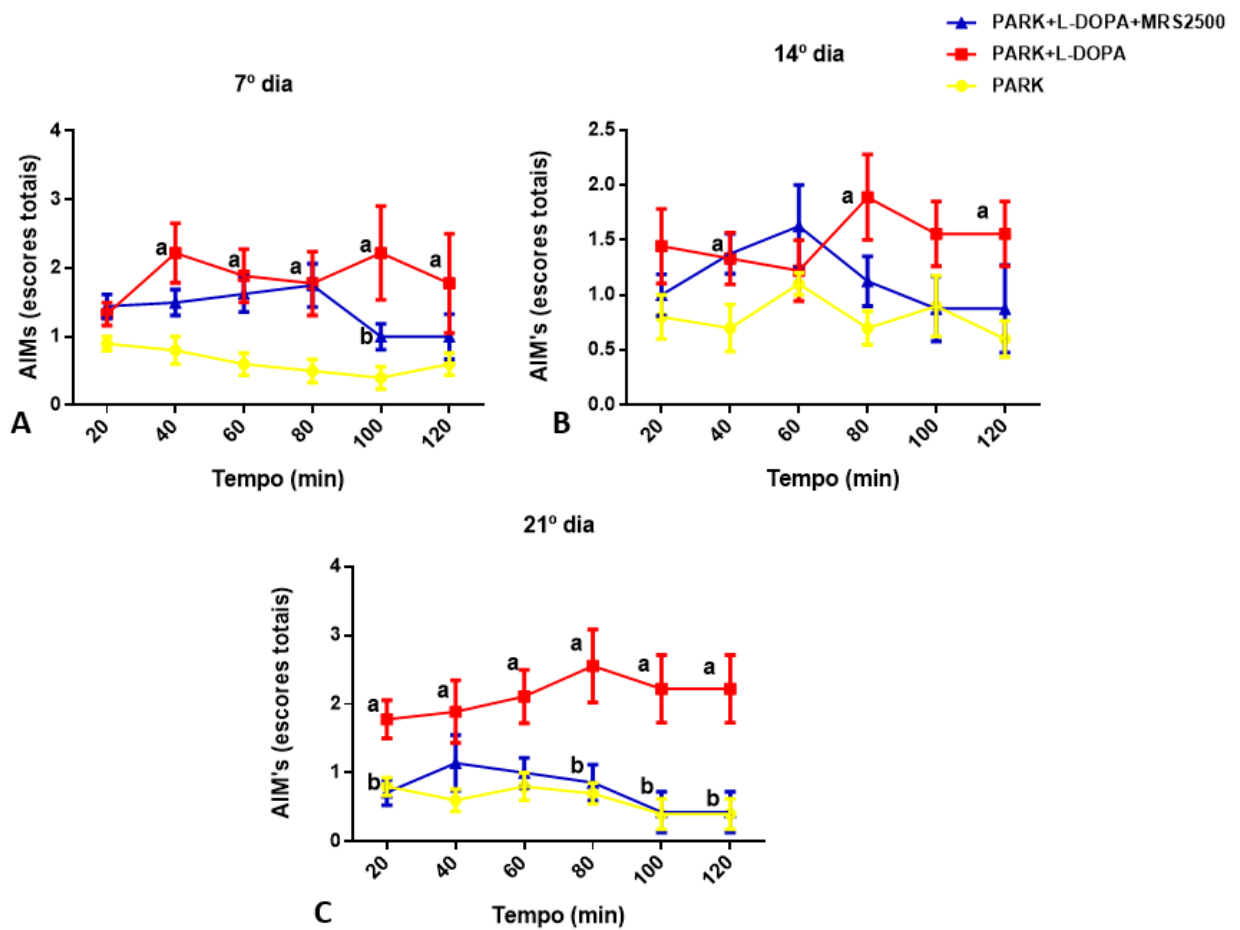
A curva do tempo após 7 dias de tratamento com L-DOPA mostra que os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento dos AIMS totais a partir dos 40 minutos quando os comparados com os animais parkinsonianos (PARK: 20 minutos:0,9 \pm 0,10; 40 min.:0,8 \pm 0,20; 60 min.:0,6 \pm 0,16; 80 min.:0,5 \pm 0,16; 100 min.:0,4 \pm 0,16; 120 min.:0,6 \pm 0,16; PARK+L-DOPA: 20 min.:1,3 \pm 0,16; 40 min.:2,2 \pm 0,43; 60 min.:1,9 \pm 0,38; 80 min.:1,8 \pm 0,46; 100 min.:2,3 \pm 0,64; 120 min.:2,1 \pm 0,65). Os animais tratados com MRS2500 apresentaram uma redução significativa dos movimentos anormais involuntários no tempo de 100 minutos quando comparados com os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e MRS2500, mostrando-nos um começo do seu efeito anti-discinético (PARK+L-DOPA+MRS2500: 20 minutos:1,4 \pm 0,17; 40 min.: 1,5 \pm 0,18; 60 min.:1,6 \pm 0,26; 80 min.: 1,7 \pm 0,31; 100 min.: 0,87 \pm 0,22; 120 min.: 1,0 \pm 0,32) (Figura 12 A)

Após o 14^o dia de tratamento com L-DOPA, na avaliação dos movimentos anormais involuntários houve um aumento nos tempo de 40, 80 e 120 minutos nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA em relação aos animais parkinsonianos (PARK: 20 min.:0,80 \pm 0,20; 40 min.: 0,70 \pm 0,21; 60 min.: 1,1 \pm 0,10; 80 min.: 0,70 \pm 0,20; 100 min.:0,90 \pm 0,27; 120 min.:0,60 \pm 0,16; PARK+L-DOPA: 20 min.: 1,4 \pm 0,33; 40 min.: 1,3 \pm 0,23; 60 min.:1,2 \pm 0,27; 80 min.:1,9 \pm 0,38; 100 min.: 0,9 \pm 0,27; 120 min.:0,6 \pm 0,16), o tratamento com o MRS2500 não foi capaz de reduzir os AIMS totais quando comparados com o grupo parkinsonianos tratado com L-DOPA e MRS2500 (PARK+L-DOPA+MRS2500: 20 min.:1,0 \pm 1,8; 40 min.: 1,3 \pm 0,18; 60 min.: 1,6 \pm 0,37; 80 min.:1,1 \pm 0,22; 100 min. 0,9 \pm 0,29; 120 min.: 0,9 \pm 0,39). (Figura 12 B)

No 21^o dia após o tratamento com L-DOPA, os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo dos AIMS em todos os tempos observados quando comparados com o grupo de animais parkinsonianos (PARK: 20 min.: 0,8 \pm 0,13; 40 min.:0,6 \pm 0,16; 60 min.:0,8 \pm 0,20; 80 min.:0,7 \pm 0,15; 100 min.:0,4 \pm 0,22; 120 min.: 0,4 \pm 0,22; PARK+L-DOPA: 20 min.:0,8 \pm 0,27; 40 min.:0,9 \pm 0,45; 60 min.:2,1 \pm 0,38; 80 min.: 2,5 \pm 0,53; 100 min.:2,2 \pm 0,49; 120 min.: 2,2 \pm 0,49) e os animais que foram tratados com

o MRS2500 apresentaram uma diminuição significativa dos movimentos anormais involuntários nos tempos de 20, 80, 100 e 120 minutos mostrando que o tratamento com MRS2500 foi eficaz em impedir o desenvolvimento de discinesia em animais (PARK+L-DOPA+MRS2500: 20 min.: $0,7\pm0,18$; 40 min.: $1,1\pm0,40$; 60 min.: $1,0\pm0,21$; 80 min.: $0,8\pm0,26$; 100 min.: $0,4\pm0,29$; 120 min.: $0,4\pm0,29$) (Figura 12C)

Figura 12 O MRS2500 impediu o desenvolvimento de AIMs totais após o 7º, 14º e 21º dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos

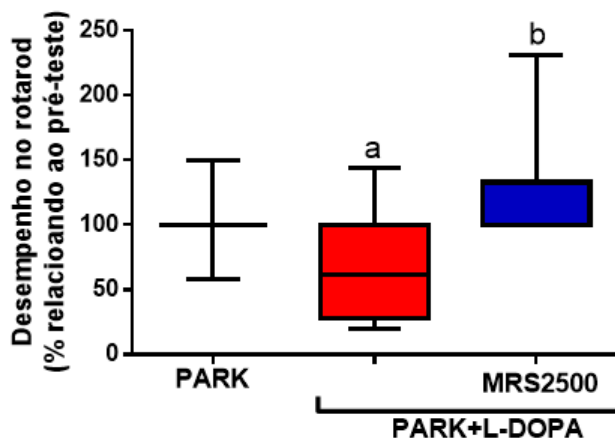


Os AIMs foram avaliados 20 minutos após a administração de L-DOPA. Valores expressos em média \pm EPM. Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.^avs PARK, ^bvs PARK+L-DOPA. Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos.

5.5 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a coordenação motora de ratos parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg).

O desempenho dos animais tratados com L-DOPA no rotarod diminuiu significativamente (PARK+L-DOPA: 62,0 (20,0 – 144,0), em relação aos animais parkinsonianos (PARK: 100 (58,0–150,0)), demonstrando que houve perda de coordenação motora. O desempenho dos animais tratados com MRS2500 foi significativamente melhor quando os comparamos com os animais parkinsoniano tratado com L-DOPA (PARK+L-DOPA+MRS2500: 100,0 (100 – 231,0) % (Figura 13).

Figura 13 Desempenho de coordenação motora de animais hemi-parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA

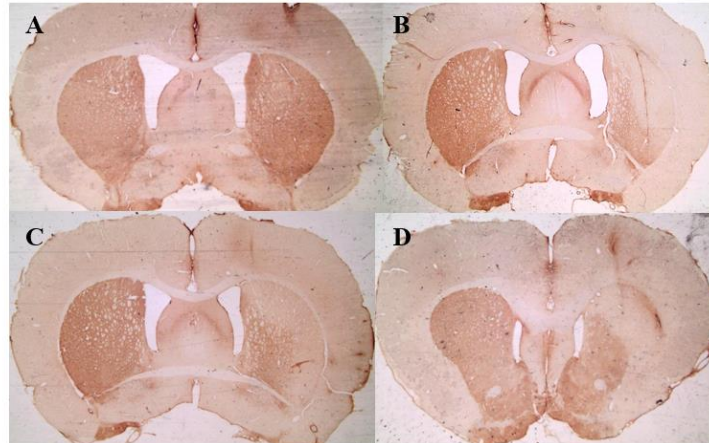


Resultados expressos em % da média da latência de 1 e 2 h relacionada ao pré-teste. Valores expressos em mediana (MIN – MAX). Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. ^avsPARK ($p < 0,0001$), ^bvs PARK+L-DOPA.

5.6 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a morte neuronal avaliada através da imunomarcação por TH no mesencéfalo e no corpo estriado de ratos parkinsonianos tratados com L-DOPA

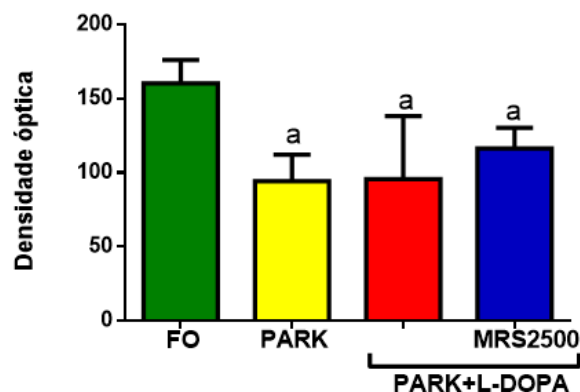
Foi observada a morte dos neurônios dopaminérgicos nos grupos de animais parkinsonianos tanto corpo estriado (Corpo estriado: FO: $160,3 \pm 7,03$; PARK: $94,30 \pm 8,98$) quanto no mesencéfalo (Mesencéfalo: FO: $108,0 \pm 9,81$; PARK: $44,77 \pm 7,36$) quando comparados com o grupo falso operado. Nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e tratados com L-DOPA + MRS2500 não foram observadas proteção da morte neuronal nestes grupos nas áreas do corpo estriado (Figura 14 e 15) e mesencéfalo (Figura 16 e 17) quando os comparamos com os animais falso operados (Corpo estriado: PARK+L-DOPA: $95,6 \pm 19,10$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $116,4 \pm 6,94$; Mesencéfalo: PARK+L-DOPA: $54,37 \pm 9,96$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $55,45 \pm 11,64$).

Figura 14 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos



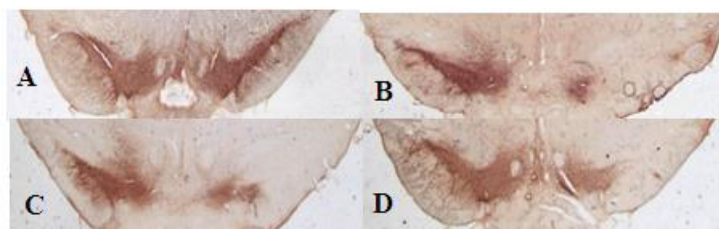
Microfotografias (aumento de 10 x) representativas da imunomarcção para TH em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C), PARK+L-DOPA+MRS2500 (D). Coloração marrom representa células imunorreativas a tirosina hidroxilase .

Figura 15 Imunomarcção para TH no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA e do MRS2500 em animais parkinsonianos



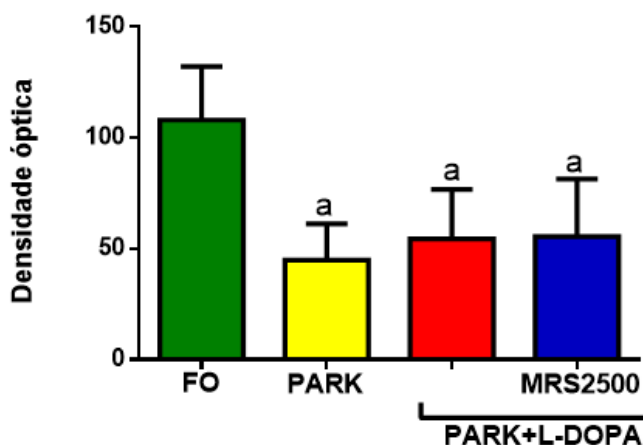
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500 (2nmol/ μ l (i.c.v.)). Em (A) está representada a quantificação da imunomarcção para TH no corpo estriado. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA seguido do teste de tukey. ^avs FO (p<0,05) (n=4).

Figura 16 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos



Microfotografias (aumento de 10 x) representativas da imunomarcção para TH em secções coronais do mesencéfalo (substância negra) dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C), PARK+L-DOPA+MRS2500 (D). Coloração marrom representa células imunorreativas a tirosina hidroxilase.

Figura 17 Imunomarcção para TH no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e do MRS2500 em animais parkinsonianos

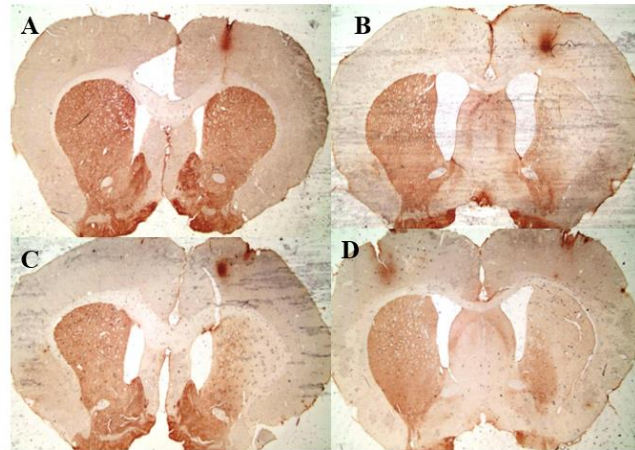


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500 (2nmol/μl (i.c.v.)). Quantificação da imunomarcção para TH no mesencéfalo. Valores expressos em média±EPM. ANOVA seguido do Teste de Tukey. ^avs FO (p<0,05) (n=4).

5.7 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a imunomarcação para DAT no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

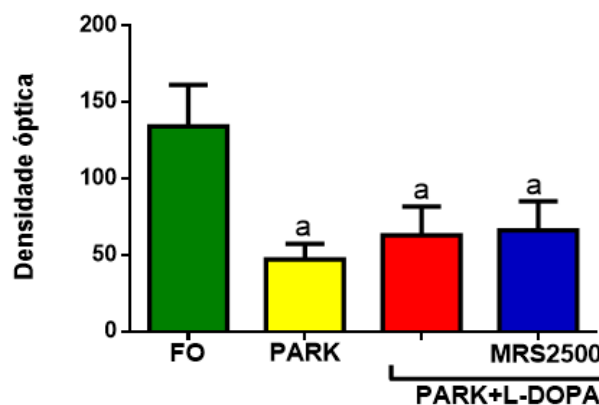
Os animais parkinsonianos apresentaram uma diminuição significativa da imunomarcação do DAT no corpo estriado (FO: $134,00 \pm 12,6$; PARK: $47,27 \pm 4,48$) (Figura 18 e 19) e no mesencéfalo (FO: $112,2 \pm 5,29$; PARK: $64,25 \pm 3,81$) (Figura 20 e 21) quando os comparamos com os animais falso operados. O tratamento com o L-DOPA não alterou a perda dos transportadores dopaminérgicos nem no estriado nem no mesencéfalo quando comparados com os animais parkinsonianos (Corpo estriado: PARK+L-DOPA: $62,98 \pm 9,39$; PARK: $47,27 \pm 4,48$; Mesencéfalo: PARK+L-DOPA: $65,35 \pm 9,68$; PARK: $64,25 \pm 3,81$). O tratamento com MRS2500 não foi capaz de proteger o déficit dos transportadores de dopamina em relação aos animais discinéticos (Corpo estriado: PARK+L-DOPA: $62,98 \pm 9,39$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $66,20 \pm 9,54$; Mesencéfalo: PARK+L-DOPA: $65,35 \pm 9,68$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $72,39 \pm 11,87$)

Figura 18 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcção para DAT no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos



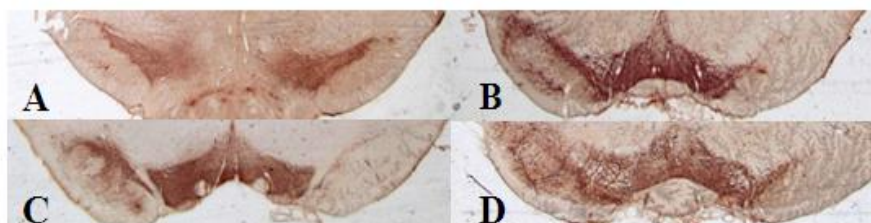
Microfotografias (aumento de 10 x) representativas da imunomarcção para DAT em secções coronais do Corpo Estriado dos grupos FO (A), PARK (B), DISC (C), PARK+L-DOPA+MRS2500 (D).

Figura 19 Quantificação da imunomarcção para DAT corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos



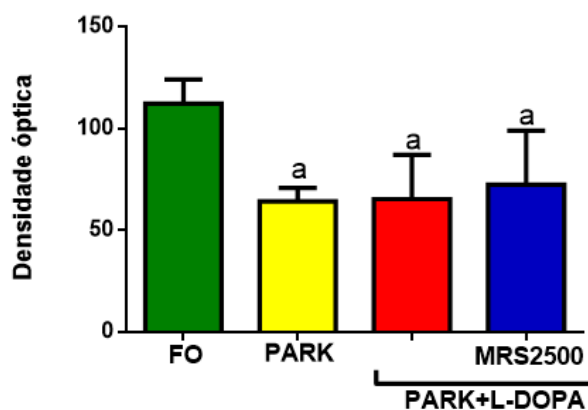
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA seguido do Teste de Tukey. ^avs FO ($p < 0,05$) ($n=4$).

Figura 20 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcação para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsoniano



Microfotografias (aumento de 10 x) representativas da imunomarcação para DAT em secções coronais do Mesencéfalo dos grupos FO (A), PARK (B), DISC (C), DISC+MRS2500 (D).

Figura 21 Quantificação da imunomarcação para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos



Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA seguido do Teste de Tukey. ^avs FO ($p < 0,05$) ($n=4$).

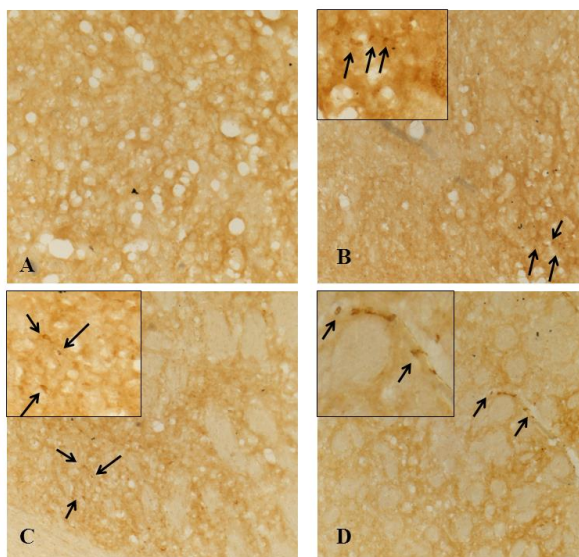
5.8 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a neuroinflamação avaliada através da imunomarcção de COX-2 no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.

Os animais parkinsonianos apresentaram um aumento significativo na imunomarcção para COX quando os comparados com os animais falso operados tanto no corpo estriado (FO: $0,25 \pm 0,2$; PARK: $4,9 \pm 0,4$) (Figura 22 e 23) como no mesencéfalo (FO: $0,3 \pm 0,4$; PARK: $14,9 \pm 3,1$) (Figura 24 e 25).

Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA tiveram um aumento significativo de células COX-2 positivas em relação aos animais parkinsonianos tanto no corpo estriado (PARK: $4,9 \pm 0,4$; PARK+L-DOPA: $11,8 \pm 1,1$) quanto no mesencéfalo (PARK: $14,9 \pm 3,1$; PARK+L-DOPA: $26,45 \pm 1,5$)

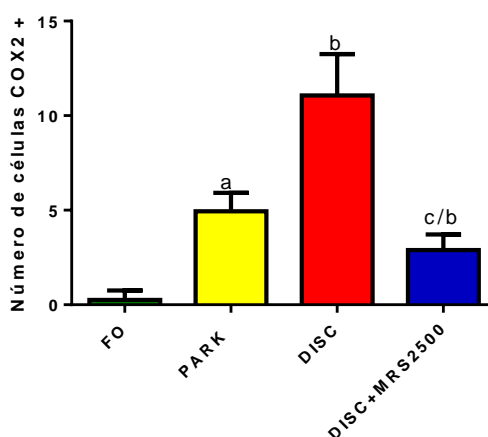
O MRS2500 conseguiu proteger do aumento das células COX-2 positivas, diminuindo assim o número destas quando os comparamos com os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA tanto no corpo estriado (PARK+L-DOPA: $11,8 \pm 1,1$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $2,9 \pm 0,4$) quanto no mesencéfalo (PARK+L-DOPA: $11,8 \pm 1,1$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $12,4 \pm 2,2$) mostrando o seu efeito na melhora da neuroinflamação induzida por L-DOPA

Figura 22 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcação para COX-2 no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA



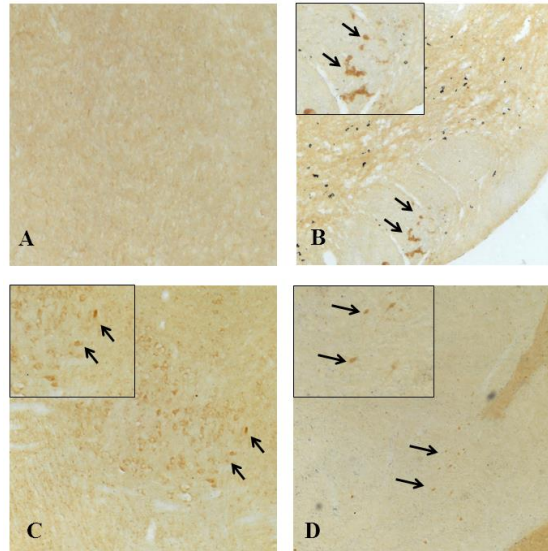
Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcação para COX-2 em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C) e PARK+L-DOPA + MRS2500 (D). O quadrado no canto superior esquerdo representa o aumento das células COX-2 positivas

Figura 23 Quantificação do número de células COX-2 positivas no corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA



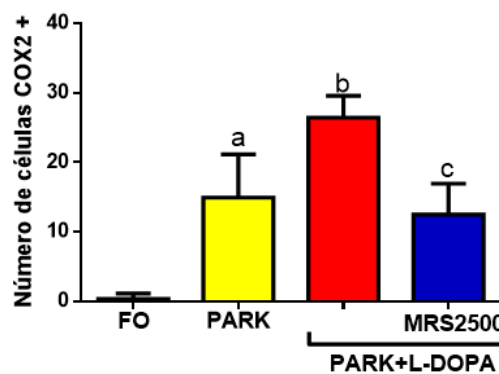
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500 (2nmol/ μ l (i.c.v.) Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK., ^cvs PARK+L-DOPA ($p < 0,05$) (n=4).

Figura 24 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a imunomarcação para COX-2 no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.



Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcação para COX-2 em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C) e PARK+L-DOPA+MRS2500 (D). O quadrado no canto superior esquerdo representa o aumento das células COX-2 positivas

Figura 25 Quantificação do número de células COX-2 positivas no mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA

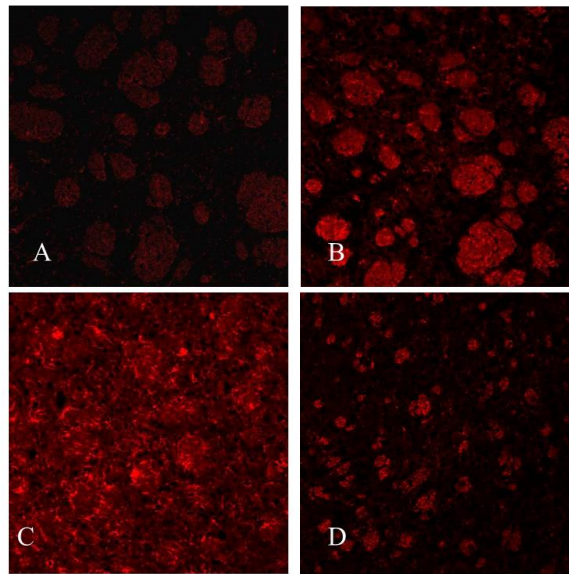


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500 (2nmol/ μ l (i.c.v.)). Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK., ^cvs PARK+L-DOPA (p<0,05) (n=4).

5.9 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre ativação de micróglia avaliada através da imunomarcção por CD11b no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.

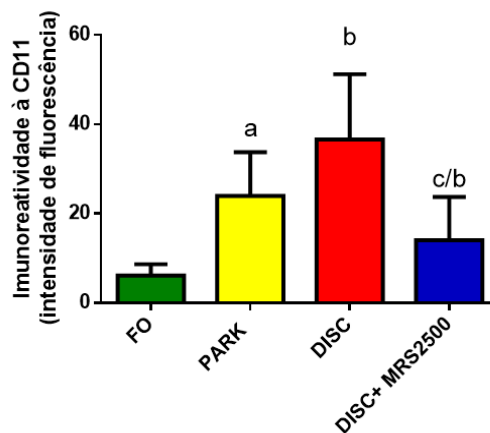
Os animais parkinsonianos apresentaram um aumento significativo de imunofluorescência para CD11, marcador de micróglia, em relação aos animais falso operados tanto no estriado (FO: $6,11 \pm 0,6$; PARK: $23,99 \pm 1,3$) (Figura 26 e 27) quanto no mesencéfalo (FO: $7,95 \pm 2,0$; PARK: $36,83 \pm 2,3$) (Figura 28 e 29). Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo de imunofluorescência quando os comparamos com os animais parkinsonianos, tanto no estriado (PARK: $23,99 \pm 1,3$; PARK+L-DOPA: $36,62 \pm 1,8$) como no mesencéfalo (PARK: $36,83 \pm 2,3$; PARK+L-DOPA: $45,25 \pm 2,9$). Houve uma redução da imunofluorescência nos animais tratados com MRS2500 em relação aos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA tanto no estriado (PARK+L-DOPA: $36,62 \pm 1,8$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $14,05 \pm 1,2$) quanto no mesencéfalo (PARK+L-DOPA: $45,25 \pm 2,9$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $15,27 \pm 1,7$) demonstrando assim, que o MRS2500 tem a capacidade de diminuir a ativação microglial.

Figura 26 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcagem para CD11b no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos



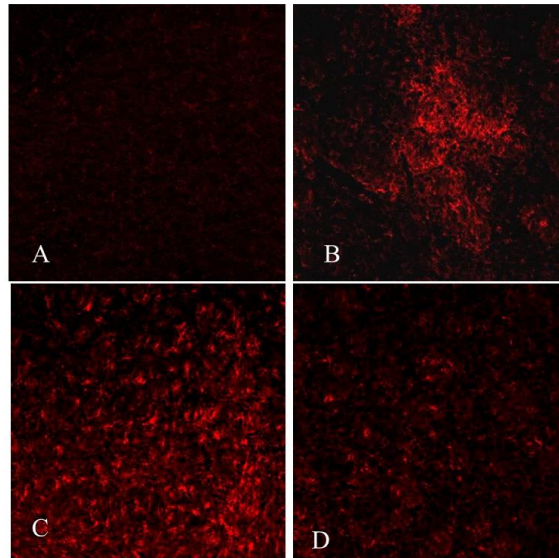
Microfotografias (aumento de 20 x) representativas da imunomarcagem para CD11b em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C), PARK+L-DOPA + MRS2500 (D).

Figura 27 Quantificação da imunofluorescência para CD11b no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos.



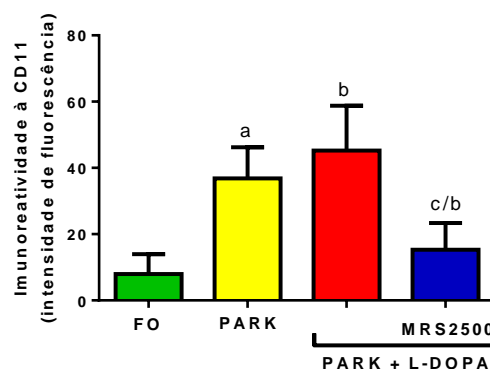
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500. Quantificação da imunomarcagem para CD11b no corpo estriado. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK, ^cvs PARK+L-DOPA. ($p < 0,05$) (n=4).

Figura 28 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 20 x) representativas da imunomarcção para CD11b em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C), PARK+L-DOPA + MRS2500 (D)

Figura 29 Quantificação da imunofluorescência para CD11b no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e MRS2500 em animais parkinsonianos.

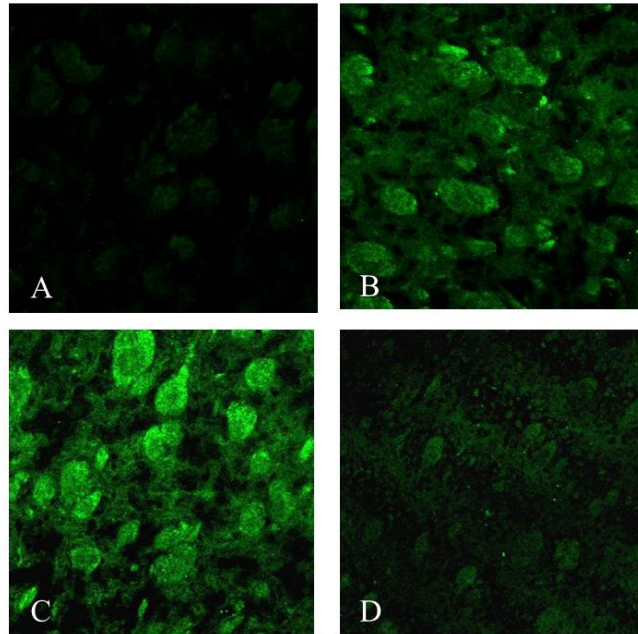


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500. Quantificação da imunomarcção para CD11b no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK, ^cvs PARK+L-DOPA. ($p < 0,05$) (n=4).

5.10 Efeito do MRS2500 2nmol/ μ l (i.c.v.) sobre ativação de astrócitos avaliada através da imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.

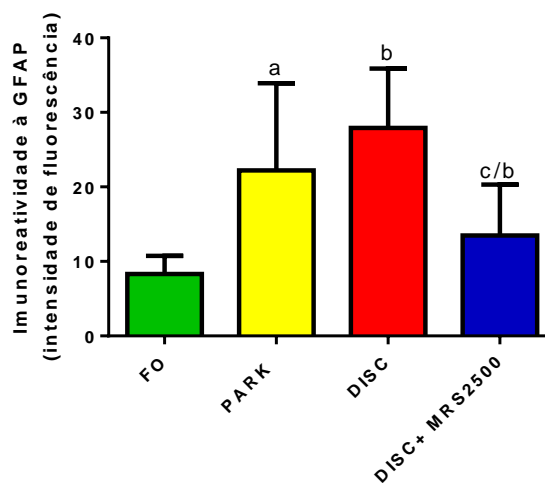
Os animais parkinsonianos apresentaram aumento significativo da imunofluorescência para GFAP quando comparado ao grupo falso-operado, demonstrando aumento da astrogliose induzida pela 6-OHDA mesmo após 36 dias da injeção tanto no mesencéfalo (FO: $11,98 \pm 0,8$; PARK: $25,6 \pm 1,5$) (Figura 32 e 33), quanto no corpo estriado (FO: $8,30 \pm 0,7$; PARK: $22,21 \pm 1,6$) (Figura 30 e 31). Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA demonstraram aumento significativo de imunofluorescência para GFAP em ambas as áreas cerebrais quando os comparamos com os animais parkinsonianos (Mesencéfalo: PARK: $25,6 \pm 1,5$; PARK+L-DOPA: $32,41 \pm 2,1$ IF; Corpo estriado: PARK: $22,21 \pm 1,6$; PARK+L-DOPA: $27,91 \pm 1,1$). Os animais tratados com MRS2500 apresentaram uma diminuição significativa da astrogliose no estriado (PARK+L-DOPA: $27,91 \pm 1,1$; PARK+L-DOPA + MRS2500: $13,47 \pm 0,8$) e mesencéfalo (PARK+L-DOPA: $32,41 \pm 2,1$; PARK+L-DOPA+MRS2500: $18,95 \pm 1,4$).

Figura 30 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcacão por GFAP no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA



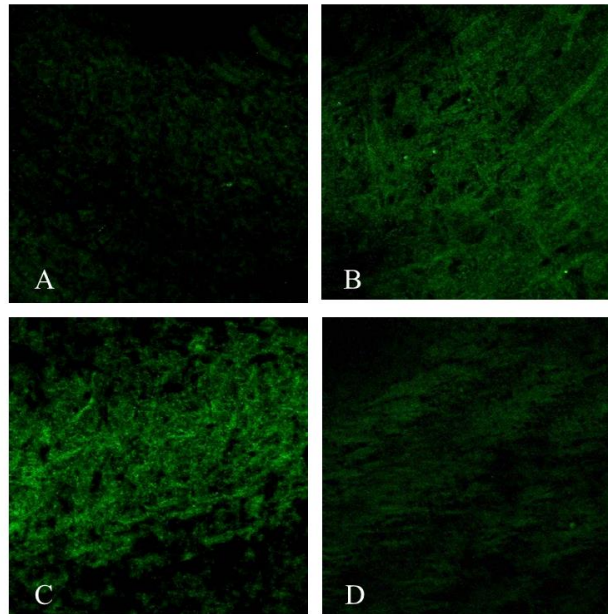
Microfotografias (aumento de 20 x) representativas da imunomarcacão para GFAP em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C), PARK+L-DOPA + MRS2500 (D)

Figura 31 Quantificacão da imunofluorescência para GFAP no corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA



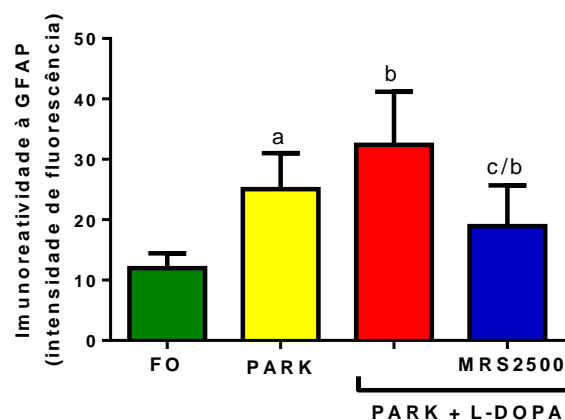
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK, ^cvs PARK+L-DOPA. ($p < 0,05$) (n=4).

Figura 32 Efeito da L-DOPA e do MRS2500 sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcagem por GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA



Microfotografias (aumento de 20 x) representativas da imunomarcagem para GFAP em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), PARK (B), PARK+L-DOPA (C), PARK+L-DOPA+MRS2500 (D)

Figura 33 Quantificação da imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA



Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com MRS2500 Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK, ^cvs PARK+L-DOPA. ($p < 0,05$) ($n=4$).

6 DISCUSSÃO

A terapia de reposição de dopamina com L-DOPA ainda é o principal tratamento para a doença de Parkinson, porém o seu uso crônico tem como efeito colateral a discinesia que em muitos casos é mais incapacitante que a própria doença de Parkinson (FONTELES, *et al.*, 2020). É importante ressaltar também que a L-DOPA é uma das melhores drogas a ser tolerada para o tratamento da DP, particularmente na população idosa, além disso, a capacidade de resposta a L-DOPA é um critério de diagnóstico chave para DP (NUTT *et al.*, 2005). Muitos trabalhos tentam descrever os mecanismos fisiopatológicos da discinesia induzida por L-DOPA, contudo, as mudanças neste processo ainda são pouco conhecidas. A grande colaboração desse trabalho foi demonstrar que o bloqueio dos receptores P2Y1 através do uso crônico do antagonista seletivo, o MRS2500, na dose de 2 nmol/ μ l (i.c.v.) foi capaz de diminuir a discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA em ratos com parkinsonismo. Este estudo demonstra pela primeira vez o envolvimento do MRS2500, antagonista seletivo dos receptores P2Y1, nos mecanismos de discinesia induzida por L-DOPA.

Neste trabalho, para a investigação da discinesia induzida pela administração crônica de L-DOPA, utilizamos o modelo de indução de lesão estriatal pela 6-OHDA em ratos, este modelo causa a degeneração de células da substância negra que é o principal fator responsável pelas alterações na função dos núcleos da base que leva ao aparecimento de discinesia após a administração de L-DOPA (BASTIDE *et al.*, 2015). Com isso, a perda de neurônios e fibras tanto no estriado como na substância negra após a administração da 6-OHDA amplia a compreensão do perfil temporal da neurodegeneração nesse modelo (RENTSCH, *et al.*, 2019).

Para analisarmos as lesões causadas pela 6-OHDA, utilizamos o teste da apomorfina que é padrão ouro por ser um teste robusto, confiável e detecta as alterações na sensibilidade dos receptores de dopamina estriatais, proporcionando dessa forma, a verificação de extensas lesões nigroestriatais e já foi padronizado em outros trabalhos do nosso laboratório (FONTELES, *et al.*, 2020; LIMA, *et al.*, 2017). A apomorfina é um agonista dopaminérgico e, quando nós a usamos como desafio para avaliar a lesão dopaminérgica os animais apresentaram um comportamento rotatório contralateral à lesão, isso ocorre pelo fato

de que os receptores pós-sinápticos dopaminérgicos estriatais estão hipersensibilizados no lado desnervado, apresentando uma *up regulation* dos receptores D2. Com isso, a estimulação pela apomorfina produz rotações contralaterais à lesão (CARMO, *et al*, 2014). Neste trabalho, o teste de apomorfina foi realizado para avaliarmos a extensão da lesão nigroestriatal dos animais parkinsonianos e selecionarmos os animais que parkinsoniano para receberem os tratamentos com L-DOPA e/ou MRS2500.

Através da observação dos movimentos anormais involuntários que aparecem após a administração da L-DOPA é que é possível avaliar a discinesia em animais parkinsonianos (BRAVO,2019). Os movimentos anormais involuntários induzidos em modelos animais exibem o mesmo perfil da discinesia de pico de dose (o padrão da discinesia mais observado clinicamente), aumento da severidade ao longo dos 42 dias de tratamento com L-DOPA e respondem clinicamente a tratamentos anti-discinéticos tais como memantina (OGAWA,2019). Vale ressaltar que trabalhos onde a L-DOPA foi administrada de por infusão contínua, sem os picos de dose, a intensidade dos sintomas motores foram diminuídos (ANTONINI, *et al.*,2016)

A dose diária de L-DOPA prescrita para pacientes com DP é cerca de 2.000 mg, divididas em 4 doses durante o dia, devido a sua meia-vida curta (JENNER, 2008). No nosso trabalho a dose de 30 mg/kg utilizada corresponderia a uma dose de cerca de 300 mg/kg em humanos. Ou seja, a dose utilizada para induzir a discinesia em ratos é bem menor do que a utilizada por pacientes. Além disso, o tempo de tratamento para que se inicie o aparecimento da discinesia, como observado em nosso estudo, é de apenas 7 dias de tratamento com L-DOPA, enquanto que em humanos são necessários de pelo menos 2,5 anos de tratamento para que se inicie o aparecimento da discinesia (BASTIDE *et al.*, 2015).

Neste trabalho dividimos os movimentos anormais involuntários em AIM's totais, ALO AIM's e AIM's locomotores. Os ALO AIM's correspondem às características de: 1. postura distônica, torção coreiforme do pescoço, torção do corpo por cima do próprio eixo para o lado contralateral a lesão; 2. AIM's dos membros- movimento anormal e desproporcional dos membros anteriores e digitopressão; 3. AIM's orolingual - mastigação involuntária e protusão da língua contralateral a lesão. Podemos observar que a L-DOPA induziu a discinesia em animais parkinsonianos a partir da primeira semana de tratamento e o MRS2500 teve o

seu efeito anti-discinético a partir da segunda semana de tratamento. Corroborando com nossos estudos temos BORTOLANZA que em 2015 utilizou o mesmo modelo de discinesia usando a mesma dose de L-DOPA (30 mg/kg) constatando a presença da discinesia em animais tratados cronicamente com a L-DOPA. Nos AIM's locomotores, onde a principal característica é o movimento circular com as quatro patas no chão contralateral a lesão, observamos que os animais tratados cronicamente com a L-DOPA apresentaram características discinéticas na primeira, segunda e terceira semana mas o efeito anti-discinético do MRS2500 mostrou-se apenas na terceira semana. Relatórios iniciais sugeriram que o aumento da amplitude da resposta rotacional contralateral era causada pela sensibilização dos gânglios da base semelhante ao que se pensa subjacente ao desenvolvimento de discinesias (PADOVAN,2011). Nos AIM's totais destacamos a variação da soma dos escores ao longo dos minutos nas três semanas, isso acontece provavelmente quando os animais apresentam uma discinesia severa (BRAVO, 2019). Na terceira semana é onde ocorre o pico de discinesia quando comparamos com as semanas anteriores e o maior efeito antidiscinético do MRS2500. Em outros trabalhos também mostraram que a exposição repetida a L-DOPA modifica e sensibiliza o cérebro de tal maneira que em longo prazo leva ao aumento da discinesia (NADJAR *et al.*, 2009). Lindgren em 2009, estudou o efeito quantitativo e temporal da administração de L-DOPA em animais parkinsonianos e observou que os movimentos anormais involuntários por unidade de concentração de DA extracelular estriatal foi de fato muito maior em animais discinéticos em comparação com casos não discinéticos na maioria dos pontos de tempo examinados mostrando que tanto uma alta liberação de DA após a administração de L-DOPA quanto uma maior capacidade de resposta à DA devem coexistir para uma expressão completa da discinesia. Estudos mostraram a comparação da administração da L-DOPA de forma pulsátil e crônica e a administração de forma contínua resultando no aumento dos movimentos anormais involuntários por parte dos animais que foram tratados da forma pulsátil e crônica e os animais que receberam a L-DOPA de forma contínua não apresentaram os AIM's (MULAS, *et al.*, 2016) Não existe nenhum trabalho onde o antagonista do receptor P2Y1 seja usado para experimentação em animais com discinesia, porém, FONTELES *et al.*, em 2020 demonstrou que um antagonista purinérgico do tipo P2X7, o BBG, apresentou uma melhora tanto no ALO AIMS quanto nos AIMS locomotores corroborando assim com o nosso trabalho de que existe um envolvimento dos receptores do tipo P2 na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA.

Outro aspecto importante a ser avaliado em relação à administração crônica de L-DOPA é a coordenação motora. Para esse objetivo utilizamos o teste do rotarod que avalia o equilíbrio e a coordenação motora, registrando a capacidade dos ratos permanecerem em uma haste rotativa. Neste trabalho, os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA tiveram um déficit da coordenação motora em relação aos animais parkinsonianos, assim como descrito na literatura (MARONGIU, 2016; IDERBERG *et al.*, 2015) e o tratamento com o MRS2500 conseguiu reverter melhorando assim a coordenação motora e equilíbrio. Corroborando com nossos resultados temos FONTELES *et al.* 2020, que utilizou o BBG, este um representante purinérgico que melhorou a coordenação motora dos animais discinéticos através da avaliação com o rotarod. Com isso, podemos sugerir que o efeito anti-discinético do MRS2500 aumenta com o tratamento prolongado, podendo ser eficaz no controle do pico de discinesia após a administração de uma dose de L-DOPA, relatadas na literatura como discinesias do tipo “On”, bem como no controle das discinesias do tipo “Off”, onde o paciente apresenta um pico de discinesia mesmo sem a administração de uma dose de L-DOPA (GURIDI *et al.*, 2008).

A morte neuronal induzida pela 6-OHDA foi analisada através da imunomarcagem da tirosina hidroxilase, que é a enzima passo limitante da reação que converte a tirosina em L-DOPA (SIEGEL, *et al.*, 2007). Em nosso trabalho, todos os animais lesionados com a neurotoxina 6-OHDA, apresentaram uma diminuição da imunomarcagem desta enzima, quando os comparamos com os animais falso operados e o tratamento com o MRS2500 não conseguiu reverter essa perda neuronal. FONTELES *et al.* 2020, corroborando com nossos resultados também demonstrou a validação do modelo, onde os animais parkinsonianos e discinéticos apresentaram morte neuronal com a diminuição da imunomarcagem da TH, assim como o BBG, antagonista purinérgico não foi capaz de reverter este dano, tanto no estriado como no mesencéfalo. Outro estudo utilizando o modelo de indução da discinesia através da administração da L-DOPA, mostrou a diminuição da imunomarcagem da tirosina hidroxilase nos grupos discinéticos e parkinsonianos e a ativina A, droga de estudo também não conseguiu reverter essa lesão (RENTSCH, *et al.*, 2019). Salientamos que após uma semana da administração da 6-OHDA a lesão está completamente estabelecida e que a perda neuronal continua progredindo até por cerca de 3 semanas (RENTSCH, *et al.*, 2019). No nosso trabalho o tratamento foi feito no 15º dia, tanto da administração da L-DOPA quanto do MRS2500. É importante observarmos que o tratamento com L-DOPA, iniciado no 15º dia após a injeção da 6-OHDA, também não é capaz de reverter a morte neuronal causada pela neurotoxina, pois o

tratamento com L-DOPA é uma estratégia de reposição de dopamina e não tem a capacidade de interferir nos mecanismos fisiopatológicos que induzem a morte neuronal dopaminérgica não possuindo ação de neuroregeneração em modelos experimentais e o tratamento crônico com a L-DOPA em pacientes com Parkinson não é capaz de inibir a progressão da doença (PADOVAN-NETO *et al.*, 2013; KATZENSCHLAGER; LEES, 2002). Diante do exposto, podemos concluir que a diminuição da discinesia induzida por L-DOPA, observada no teste dos movimentos involuntários anormais, não é reflexo da proteção do MRS2500 frente à ação neurotóxica da 6-OHDA, mas sim da sua participação nos mecanismos envolvidos na indução da discinesia por L-DOPA em si, atuando por mecanismos pré e/ou pós-sinápticos, alterando a liberação de DA no corpo estriado.

O transportador de dopamina, presente na membrana pré-sináptica de neurônios dopaminérgicos realiza a recaptação da DA, diminuindo seu conteúdo na fenda sináptica. A degeneração neuronal dopaminérgica leva a diminuição dos níveis de DAT, bem como de outros transportadores como SERT e NET (transportador de serotonina e de norepinefrina, respectivamente) (ARAI *et al.*, 2008). Nosso resultado mostrou que os níveis de DAT estão diminuídos no mesencéfalo e estriado dos animais parkinsonianos e parkinsonianos tratados com L-DOPA, assim como descrito na literatura (FONTELES, *et al.*, 2020; RENTSCH, *et al.*, 2019). O tratamento com MRS2500 por sua vez não conseguiu reverter o déficit de DAT ocasionado pela degeneração neuronal dopaminérgica. TOMAS e colaboradores em 2016 mostraram que a restauração dos transportadores de dopamina diminuiu a discinesia. Outro estudo também observou que antagonista de DAT, GBR-12909, aumentou a discinesia induzida por L-DOPA em ratos submetidos a lesão intra-estriatal por 6-OHDA, bem como o antagonismo do transportador de noradrenalina (NET) também aumentou a discinesia nos animais (CONTI *et al.*, 2016). Em desacordo com estes estudos, uma pesquisa clínica com 73 pacientes mostrou que, a densidade de DAT estriatal, avaliada usando 123I-FP-CIT-SPERCT no diagnóstico, não diferencia entre os pacientes que desenvolveram LIDs (Discinesia induzida por L-DOPA) daqueles que não se tornaram discinéticos durante o período de 5 anos, concluindo assim, que o DAT por si, não se relaciona com a ocorrência de discinesia futura em pacientes com DP que utilizam L-DOPA (ROUSSAKIS, *et al.*, 2019). Com isso, nossos resultados sugerem que o efeito anti-discinético do MRS2500 visto nos resultados dos testes de comportamento não está relacionado com a restauração dos transportadores de dopamina e sim provavelmente por mecanismos que envolvam a inflamação.

Para elucidarmos como o bloqueio do receptor P2Y1 diminui a discinesia induzida por L-DOPA, e visto que o receptor P2Y1 está relacionado com a inflamação, investigamos a indução de neuroinflamação pela L-DOPA e o efeito do MRS2500 neste mecanismo. Alguns estudos sugerem que a inflamação está relacionada com o desenvolvimento da discinesia. Barnum e colaboradores (2008) demonstraram que a administração exógena de corticosterona reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em ratos parkinsonianos. A COX-2 é expressa principalmente por células do sistema imune e/ou estão envolvidas na resposta inflamatória como macrófagos, monócitos e sua principal característica é a isoforma induzível, com isso, existe a necessidade de um estímulo para levar a sua expressão que normalmente é patológico (FIEBICH,2019). Em nosso trabalho, os animais parkinsonianos e os parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram um aumento significativo do número de células COX-2 positivas, alguns trabalhos do nosso grupo corroboram com estes achados como Carmo e colaboradores (2014) que no modelo de parkinson observou-se que os animais parkinsonianos apresentaram um aumento das células COX-2 positivas e Fonteles e colaboradores (2020) no modelo de discinesia induzida por L-DOPA observou um aumento de células COX-2 positivas nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e que o BBG, um antagonista purinérgico assim como o MRS2500, conseguiu reverter, diminuindo assim o número de células COX-2 positivas no corpo estriado. O MRS2500 conseguiu reverter esse aumento de células COX-2 positivas, diminuindo sua expressão tanto no mesencéfalo como no estriado. A literatura mostra que os receptores purinérgico do tipo P2 agem modulando a resposta inflamatória, quando ocorre uma lesão neuronal os neurônios danificados liberam ATP e esse ATP liberado em excesso, apesar dos mecanismos que regulam sua concentração fora da célula, ativa uma ampla variedade de receptores purinérgicos presentes nas células vizinhas, modulando a atividade glial e a resposta neuronal à inflamação, através também da ativação da COX-2 o que leva ao aumento de dano nos tecidos e inflamação crônica (FIEBICH,2019). Alguns trabalhos em que se usaram o tratamento com dois anti- inflamatórios não esteroidais, o Celec (inibidor específico da COX-2) e a Indo (inibidor reversível de COX-1 e COX-2) não diminuíram a manifestação de AIMs induzidos por L- DOPA ou a expressão desta enzima no estriado e com isso, mostrou que o uso somente de antiinflamatórios não esteroidais ou mesmo de corticóides tem resultados limitados em relação aos movimentos anormais involuntários da LID (DEL BEL *et al.*, 2016). As prostaglandinas derivadas da COX-2 também estão envolvidas no processo de

regulação do sinal dopaminérgico, com isso, seu aumento pode aumentar a sinalização dos receptores D1 e D2, aumentando os níveis de flutuação da dopamina resultando no aumento dos AIM's (FURUYASHIKI e NARUMIYA, 2011) Nossos resultados sugerem que o bloqueio dos receptores P2, por meio do MRS2500 antagonista seletivo dos receptores do tipo P2Y1, irá diminuir a liberação excessiva de ATP, em casos de danos neuronais, diminuindo assim a liberação de mediadores inflamatórios de uma maneira mais ampla, sendo esse um possível mecanismo para a melhora da discinesia.

Além da COX-2, observamos também uma astrogliose e microgliose nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA. A microglia é a primeira linha de defesa do sistema imunológico central, que é ativada em resposta a patógenos invasores ou a qualquer lesão ou dano neuronal. Como na inflamação periférica, as respostas agudas e crônicas no sistema nervoso central (SNC) são distinguíveis e ambas envolvem a ativação da microglia junto com macrófagos perivasculares e astrócitos (PISANU, et al.,2018). Portanto, a microglia cumpre sua tarefa através da produção e liberação de uma variedade de fatores solúveis, incluindo citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, fatores de crescimento, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que conferem à microglia um pró-inflamatório ou fenótipo anti-inflamatório (WOLF *et al.* 2017). A astrogliose e microgliose estão relacionados à administração da L-DOPA, aspectos como sua farmacocinética e modo de liberação estão envolvidos, e não apenas a lesão causada por 6-OHDA, visto que o tratamento com L-DOPA aumentou a astrogliose e microgliose em relação aos animais parkinsonianos, sugerindo assim, que a L-DOPA, administrada cronicamente, possua ação pró-inflamatória, aumentando essa superexpressão de citocinas sendo um dos possíveis mecanismos fisiopatológicos que podem contribuir para o desenvolvimento da LID. Essas citocinas pró-inflamatórias produtoras de microglia são altamente representadas em estágios avançados da doença, na presença de degeneração dopaminérgica maciça, apesar de um baixo número de microglia antiinflamatória (JOERS *et al.* 2017). A farmacoterapia com L-DOPA afeta não apenas os neurônios, mas também a glia e compartimentos dentro dos gânglios basais e do mesencéfalo, ela se acumula principalmente nos astrócitos em torno dos vasos sanguíneos e pericitos (INYUSHIN *et al.*, 2012). Os astrócitos estriatais atuam como um reservatório para L-DOPA, para que possam captar ou liberar a L-DOPA dependendo de sua concentração extracelular (ASANUMA *et al.*, 2014; INYUSHIN *et al.*, 2012). Astrócitos cultivados também são capazes de converter LDOPA em dopamina. O efeito terapêutico de L-DOPA ocorre através

da descarboxilação e, portanto, sua transformação em dopamina. Se não for regulado, este processo também pode ser parte do mecanismo que induz toxicidade (BORTOLANZA *et al.*, 2015a; INYUSHIN *et al.*, 2012; OHLIN *et al.*, 2011). Outros trabalhos também mostraram que o tratamento agudo com L-DOPA aumentou a expressão da micróglia e do astrócito quando comparados com os animais parkinsonianos (BORTOLANZA, *et al.*, 2015). Mulas em 2016, experimentou a administração crônica e pulsátil da L-DOPA, fazendo um pré tratamento com LPS e observou que houve um aumento do grau de AIMS induzidos por L-DOPA pulsátil e IR estriatal para OX-42, TNF- α , iNOS e GFAP, mostrando que no modelo 6-OHDA, a L-DOPA crônica induz respostas inflamatórias estriatal, que no entanto dependem do regime de administração e do resultado discinético do tratamento com drogas e a potencialização das respostas discinéticas por LPS sugerem uma ligação causal recíproca entre neuroinflamação e LID. Clinicamente já se sabe que pacientes com DP apresentam aumento de interleucinas inflamatórias (BLUM-DEGENet *et al.*, 1995; MOGI *et al.*, 1994) e de micróglia ativada (MCGEERet *et al.*, 1988; BANATI *et al.*, 1998; MIRZAet *al.*, 2000; GERHARD *et al.*, 2006; OUCHI *et al.*, 2005).

O MRS2500 conseguiu proteger esse aumento da astrogliose e microgliose tanto no estriado quanto no mesencéfalo. O mecanismo pelo qual o MRS2500 diminui a astrogliose e microgliose é que os receptores P2Y1 são expressos em micróglia, neurônios e astrócitos e são ativados por ATP e ADP que são liberados em casos de isquemia ou lesões cerebrais, com o bloqueio dos receptores P2Y1 essa ativação microglial e astrocitária é diminuída, diminuindo assim a inflamação e melhorando a discinesia, também foi relatado que o bloqueio dos receptores P2Y1 modulam o dano cerebral (KITA, *et al.*, 2019). Fonteles e colaboradores em 2020 demonstraram que o bloqueio dos receptores do tipo P2 também diminuíram a expressão de astrócitos e micróglia no modelo de discinesia induzido por L-DOPA. Estudos utilizando o MRS2500 mostraram que os receptores P2Y1 desempenham múltiplas funções nas células gliais para regular processos nociceptivos e que estes receptores acoplados à proteína G medeiam a quimiotaxia dependente de ATP que estimula o glutamato aumentando a excitabilidade neuronal, a micróglia ativada também pode liberar o ATP desencadeando modulação mediada por astrócitos da neurotransmissão excitatória e efeitos neuroprotetores via P2Y1, além disso, a sinalização do receptor P2Y em SGCs de gânglios trigeminiais de rato pode ser potencializada por mediadores nociceptivos ou pró-algogênicos

de neurônios, incluindo peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e prostaglandina E2 (RAJASEKHAR, *et al.*, 2015)

Outros mecanismos, além da inflamação parecem estar envolvidos na discinesia. Estudos demonstram potencial atividade pró-oxidante da L-DOPA, sugerindo que a mesma aumenta o estresse oxidativo em modelos animais, aumentando o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ensaio de TBARS) que é utilizado para avaliar a peroxidação lipídica de células e tecidos (ALIREZAEI, 2015). Estudo realizado com 30 pacientes com DP demonstrou que o tratamento com L-DOPA aumenta a síntese e consumo de GSH através da quantificação da relação cisteína-glicina, demonstrando que a L-DOPA aumenta estresse oxidativo em pacientes com DP (MULLER *et al.*, 2016).

Os mecanismos pelos quais o bloqueio do receptor P2Y1, através do MRS2500, exerce efeito anti-discinético ainda não estão completamente elucidados. O modelo utilizado no presente trabalho não induz a agregação de α -sinucleína (FRANCARDO; CENCI, 2014) presentes em pacientes com DP (WIRDEFELD *et al.*, 2011). Além disso, o modelo experimental de DP induzido pela 6-OHDA não induz alterações genéticas, como por exemplo, o modelo da rotenona é capaz de induzir. Portanto, mais estudos são necessários para elucidar o papel dos receptores purinérgicos na discinesia induzida por L-DOPA.

Nossos dados sugerem que a neuroinflamação desempenha um papel importante no desenvolvimento da discinesia e que a L-DOPA, possivelmente, seja um indutor desta neuroinflamação. Além disso, a neuroinflamação induzida pela L-DOPA nos animais lesionados por 6-OHDA está relacionada, pelo menos parcialmente, com a ativação de receptores P2Y1, visto que o bloqueio do mesmo é capaz de diminuir o desenvolvimento de AIMS nos animais tratados cronicamente com L-DOPA e diminuir a neuroinflamação através da diminuição da microgliose, astrogliose e células COX-2 positivas. Não podemos descartar a participação de outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e prostaglandinas, na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA visto que não fizemos a mensuração destes parâmetros. Sendo assim, o presente trabalho demonstra a participação do sistema purinérgico no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA. Porém, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos pelos quais o sistema purinérgico participa, não podendo

descartar outras hipóteses, como alterações pós-sinápticas, ou ainda a participação de outros receptores purinérgicos.

7. CONCLUSÃO

O tratamento dos animais parkinsonianos tratados com o MRS2500, um antagonista seletivo dos receptores P2Y1, levou à diminuição da discinesia induzida por L-DOPA em animais submetidos à lesão intraestriatal pela 6-OHDA, um modelo experimental de Doença de Parkinson.

Não houve redução na degeneração neuronal induzida pela 6-OHDA nos animais tratados com o MRS2500, demonstrando assim, que o MRS2500 não tem ação neuroregenerativa, agindo apenas de modo neuroprotetor.

O tratamento com o MRS2500 não aumentou os níveis dos transportadores de dopamina, o DAT, nem no mesencéfalo, nem no estriado, o que provavelmente nos mostra não ser esse o mecanismo pelo qual o MRS2500 tenha o seu efeito anti-discinético.

Os animais tratados com o MRS2500, apresentaram uma diminuição da neuroinflamação, avaliada através da quantificação da micróglia, astrócito e células COX-2 positivas.

Podemos concluir que a neuroinflamação possivelmente é um dos mecanismos pelos quais a L-DOPA induz a discinesia sendo, portanto, um dos mecanismos pelo qual o MRS2500 possui efeito anti-discinético.

REFERÊNCIAS

ALIREZAEI, M. Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 18, n. 10, p. 950-7, 2015.

ANA P. SIMÕES, CARLA G. SILVA, JOANA M. MARQUES, DANIELA POCHMANN, LISIANE O. PORCIÚNCULA, SOFIA FERREIRA , JEAN P. OSES, RUI O. BELEZA, JOANA I. REAL, ATTILA KÖFALVI, BEN A. BAHR, JUAN LERMA, RODRIGO A. CUNHA AND RICARDO J. RODRIGUES Glutamate-induced and NMDA receptor mediated neurodegeneration entails P2Y1 receptor activation . **Cell Death and Disease** (2018) 9:297

ANDERSSON, M.; KONRADI, C.; CENCI, M.A. cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. **J Neurosci**, v. 21, p. 9930–9943, 2001.

ANTONELLA CIANCETTA*, ROBERT D. O’CONNOR, SILVIA PAOLETTA, AND KENNETH A. JACOBSON Demystifying P2Y1 Receptor Ligand Recognition through Docking and Molecular Dynamics Analyses **J Chem Inf Model**. 2017 December 26; 57(12): 3104–3123

ARAI, A.; TOMIYAMA, M.; KANNARI, K., et al. Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. **Synapse.**, v. 62, p. 632- 635, 2008.

ARULKUMARAN, N.; UNWIN, R.J.; TAM, F.W. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases.**Expert Opin Investig Drugs.**, v. 20, n. 7, p. 897-915, 2011.

BANATI, R.B.; DANIEL, S.E.; BLUNT, S. B. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease.**MovDisord.**, v. 13, n. 2, p. 221-7, 1998.

BARNUM, C. J.; ESKOW, K. L.; DUPRE, K.; BLANDINO, P. JR.; DEAK, T.; BISHOP, C. Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: role for interleukin-1 β . **Neuroscience**.v. 156, n. 1, p. 30-41, 2008.

BARTLETT, R.; SLUYTER, V.; WATSON, D.; SLUYTER, R.; YERBURY, J.J. P2X7 antagonism using Brilliant Blue G reduces body weight loss and prolongs survival in female SOD1G93A amyotrophic lateral sclerosis mice. **PeerJ**, v. 5, p. e3064, 2017.

BARTLETT, R.; STOKES, L.; SLUYTER, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. **Pharmacol Rev.**, v. 66, n. 3, p. 638-75, 2014.

BASTIDE, M.F.; MEISSNER, W.G.; PICCONI, B.; FASANO, S.; FERNAGUT, P.O.;

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, p. 325-332, 2001.

BENNETT, M.V.; GARRÉ, J.M.; ORELLANA, J.A.; BUKAUSKAS, F.F.; NEDERGAARD, M.; SÁEZ, J.C. Connexin and pannexin channels in inflammatory responses of glia and neurons. **Brain Res.**, v.1487, p. 3-15, 2012.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays**, v. 24, n. 4, p. 308-18, 2002.

BEZARD, E.; GROSS, C. E.; BROTCHE, J. M. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. **Trends Neurosci.** v. 26, p. 215–21, 2003.

BEZARD, E.; TRONCI, E.; PIOLI, E.Y., *et al.* Study of the antidyskinetic effect of eltopazine in animal models of levodopa-induced dyskinesia. **MovDisord**, v. 28, p.1088-1096, 2013.

BIDO, S.; MARTI, M.; MORARI, M. Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels. **J Neurochem.**, v. 118, n.6, p. 1043-1055, 2011.

BLANCHET, P. J.; GRONDIN, R.; BEDARD, P. J.; SHIOSAKI, K.; BRITTON, D. R. Dopamine D1 receptor desensitization profile in MPTP-lesioned primates. **Eur J Pharmacol.** Vol. 309(1), p. 13–20, 1996.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.** v. 65, p. 135-172, 2001.

BLUM-DEGEN, D.; MULLER, T.; KUHN, W.; GERLACH, M.; PRZUNTEK, H.; RIEDERER, P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. **NeurosciLett.**, v. 202, n. 1–2, p. 17–20, 1995.

BORTOLANZA, M.; CAVALCANTI-KIWIATKOSKI, R.; PADOVAN-NETO, F. E.; DA-SILVA, C. A.; MITKOVSKI, M.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL-BEL, E. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease.** v. 73, p. 377-387, 2015.

BORTOLANZA, M.; PADOVAN-NETO, F. E.; CAVALCANTI-KIWIATKOSKI, R.; SANTOS-PEREIRA, M.; MITKOVSKI, M.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL-BEL, E. Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 370, p.20140190, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

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

BURNSTOCK, G. Purinergic mechanisms broaden their sphere of influence. **Trends in neuroscience**, vol. 8, p. 5-6, 1985.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews/Drug Discovery**, vol. 7, p.575-590, 2008.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. P2X receptors in health and disease. **Adv Pharmacol.**, v. 61, p. 333-72, 2011.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol.**, v. 240, p. 31-304, 2004.

CARMO, M. R. S.; MENEZES, A. P. F.; NUNES, A. C. L.; PLIÁSSOVA, A.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M.; CUNHA, R. A.; CANA, P. M.; ANDRADE, G. M. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 142-152, 2014.

CENCI, M.A.; LUNDBLAD, M. Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **J Neurochem.**, v. 99, n. 2, p. 381-92, 2006.

CENCI, M.A.; OHLIN, K.E. Rodent models of treatment-induced motor complications in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 4, p.S13-7, 2009.

CHAPUIS, S.; OUCHCHANE, L.; METZ, O.; GERBAUD, L.; DURIF F. Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. **Mov Disord.**, v. 20, n. 2, p. 224-30, 2005.

CHEN, X.; HU, J.; JIANG, L.; XU, S.; ZHENG, B.; WANG, C.; ZHANG, J.; WEI, X.; CHANG, L.; WANG, Q. Brilliant Blue G improves cognition in an animal model of Alzheimer's disease and inhibits amyloid- β -induced loss of filopodia and dendrite spines in hippocampal neurons. **Neuroscience.**, v. 279, p. 94-101, 2014.

CHOI, Y .M.; JANG, J. Y.; JANG, M.; KIM, S. H. ; KANG, Y. K.; CHO, H.; CHUNG, S.; PARK, M. K. Modulation of firing activity by ATP in dopamine neurons of the rat substantianigra pars compacta. **Neuroscience**, v. 160, p. 587–595, 2009.

CHUN-LEI HAN, YUN-PENG LIU, YUN-PENG SUI, NING CHEN, TING-TING DU, YING JIANG, CHEN-JIA GUO, KAI-LIANG WANG, QIAO WANG, SHI-YING FAN, MICHITOMO SHIMABUKURO, FANGANG MENG, FANG YUAN, JIAN-GUO ZHANG
A associated with L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease **AGING** 2020, Vol. 12, No. 1

CONTI, M.M.; MEADOWS, S.M.; MELIKHOV-SOSIN, M.; LINDENBACH, D.; HALLMARK, J.; WERNER, D.F.; BISHOP, C. Monoamine transporter contributions to L-DOPA effects in hemi-parkinsonian rats. **Neuropharmacology.**, v. 110, n. Pt A, p. 125-34, 2016.

CONTI, M.M.; OSTOCK, C.Y.; LINDENBACH, D.; GOLDENBERG, A.A.; KAMPTON, E.; DELL'ISOLA, R.; KATZMAN, A.C.; BISHOP, C. Effects of prolonged selective serotonin reuptake inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-parkinsonian rats. **Neuropharmacology.**, v. 77, p.1-8, 2014.

CORIOLANO, M.G.W.S.; SILVA, E.G.; FORTUNA, E.S.; ASANO, A.; MONTEIRO, D.; LINS, O.G. Epidemiological profile of patients with Parkinson's disease (PD) IN THE Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco. **Neurobiologia**, v. 76, n. 1-2, p. 19-27, 2013.

CORVOL, J. C.; STUDLER, J. M.; SCHONN, J. S.; GIRAULT, J. A.; HERVÉ, D. Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. **J Neurochem**, v. 76, p. 1585–1588, 2001.

CUI, G.; YANG, X.; WANG, X.; ZHANG, Z.; YUE, X.; SHI, H.; SHEN, X. Ranitidine reduced levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Neuropsychiatr Dis Treat.**, v. 10, p.39-46, 2014.

D. TOMAS, D. STANIC, H. K. CHUA¹, K. WHITE, W. C. BOON, M. HORNE Restoration of the Dopamine Transporter through Cell Therapy Improves Dyskinesia in a Rat Model of Parkinson's Disease **PLoS ONE** 11(4): e0153424.

DARMOPIŁ, S.; MARTIN, A. B.; DE DIEGO, I. R.; ARES, S.; MORATALLA, R. Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and

DAUER W., PRZEDBORSKI S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DAVID LINDENBACH, MELISSA M. CONTI, CORINNE Y. OSTOCK, JESSICA A. GEORGE, ADAM A. GOLDENBERG, MITCHELL MELIKHOV-SOSIN, EMILY E. NUSS, AND CHRISTOPHER BISHOP The Role of Primary Motor Cortex (M1) Glutamate and GABA Signaling in L-DOPA-Induced Dyskinesia in Parkinsonian Rats **The Journal of Neuroscience**, September 21, 2016

DEL-BEL, E.; PADOVAN-NETO, F.E.; SZAWKA, R.E.; DA-SILVA, C.A.; RAISMAN-VOZARI, R.; ANSELMO-FRANCI, J.; ROMANO-DUTRA, A.C.; GUIMARAES, F.S. Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. **Neurotox Res.**, v. 25, n. 1, p. 33-44, 2014.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol.**, v. 175, n. 2, p. 303-17, 2002.

DHALL, R.; KREITZMAN, D.L. Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: Review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety. **Neurology.**, v. 5, n. 86, p. S13-24, 2016.

DI MONTE, D.A.; MCCORMACK, A.; PETZINGER, G.; JANSON, A.M.; QUIK, M.; LANGSTON WJ. Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. **MovDisord.**, v. 15, n. 3, p. 459-66, 2000.

DÍAZ-HERNANDEZ, M.; DEL PUERTO, A.; DÍAZ-HERNANDEZ, J.I.; DIEZ-ZAERA, M.; LUCAS, J.J.; GARRIDO, J.J.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. **J Cell Sci.**, v. 121, n. Pt 22, p. 3717-28, 2008.

DOO, A.; KIM, S.; HAHM, D.; YOO, H. H.; PARK, J.; LEE, H.; JEON, S.; KIM, J.; PARK, S.; PARK, H. *Gastrodia elata* Blume alleviates L-DOPA-induced dyskinesia by normalizing FosB e ERK activation in a 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease mouse model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 107, 2014.

DORSEY, E. R. *et al.* Projected number of people with Parkinson disease in the most

populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384-386, 2007.

EHARA, A.; UEDA, S. Application of Fluoro-Jade C in Acute and Chronic Neurodegeneration Models: Utilities and Staining Differences. **ActaHistochemCytochem**, v. 42, n. 6, p. 171–179, 2009.

ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **RevueNeurologique.**, v. 172, n. 1, p. 14-26, 2015.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 121–143, 2004.

FABBRINI, G.; BROTCHE, J.M.; GRANDAS, F.; NOMOTO, M.; GOETZ CG. Levodopa-induced dyskinesias. **MovDisord.**, v. 22, n. 10, p. 1379-89, 2007.

FAHN, S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. **AnnNeurol**, v. 47, p. S2–9–11, 2000.

FEPPA. **J Neuroinflammation.**, v. 14, n. 1, p. 8, 2017.

FERESHTEH FARAJDOKHTI, SAEED SADIGH-ETEGHAD, ALIREZA MAJDI, FARIBA PASHAZADEH1, SEYYED MEHDI VATANDOUST, MOJTABA ZIAEE, FATEMEH SAFARI, POURAN KARIMI, JAVAD MAHMOUDI Serotonergic system modulation holds promise for l-dopa-induced dyskinesias in hemiparkinsonian rats: a systematic review **EXCLI Journal** 2020;19:268-295

FEYDER, M.; et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **ProgNeurobiol.**, v. 132, p. 96-168, 2015.

FIORENTINI, C.; RIZZETTI, M.C.; BUSI, C.; BONTEMPI, S.; COLLO, G.; SPANO, P.; MISSALE, C. Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. **MolPharmacol.**, v. 69, n. 3, p. 805-12, 2006.

FIorentini, C.; SAVOIA, P.; SAVOLDI, D.; BARBON, A.; MISSALE, C. Persistent activation of the D1R/Shp-2/Erk1/2 pathway in L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-hydroxy-dopamine rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 54, p. 339–348, 2013.

FONTELES AA, NEVES JCS, MENEZES APF, PEREIRA JF, SILVA ATA, CUNHA RA AND ANDRADE GM (2020) ATP Signaling Controlling Dyskinesia Through P2X7 Receptors. **Front. Mol. Neurosci.** 13:111

FRANCARDO, V.; CENCI, M.A. Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 20, p. S20-2, 2014.

GAO Z-G AND JACOBSON KA (2017) Purinergic Signaling in Mast Cell Degranulation and Asthma. **Front. Pharmacol.** 8:947

GARDONI, F.; PICCONI, B.; GHIGLIERI, V.; POLLI, F.; BAGETTA, V.; BERNARDI, G.; CATTABENI, F.; DI LUCA, M.; CALABRESI, P. A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. **J Neurosci.**, v. 26, n. 11, p. 2914-2922, 2006.

GERHARD, A.; PAVESE, N.; HOTTON, G.; TURKHEIMER, F.; ES, M.; HAMMERS, A.; EGGERT, K.; OERTEL, W.; BANATI, R.B.; BROOKS, D.J. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.**, v. 21, n. 2, p. 404-12, 2006.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm**, v. 103, p. 987-1041, 1996.

GEVER, J.R.; COCKAYNE, D.A.; DILLON, M.P.; BURNSTOCK, G.; FORD, A.P. Pharmacology of P2X channels. **Pflugers Arch.**, v. 452, n. 5, p. 513-37, 2006.

GHADERY ,C.; KOSHIMORI, Y., COAKELEY, S.; HARRIS, M.; RUSJAN, P.; KIM, J.; HOULE, S.; STRAFELLA, A.P. Microglial activation in Parkinson's disease using [18F]-

GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia.** 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 169 p.

GOMES, C.V.; KASTER, M.P.; TOMÉ, A.R.; AGOSTINHO, P.M.; CUNHA, R.A. Adenosine receptor and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **BiochimBiophysActa**, v.1808, n. 5, p. 1381380-99, 2011.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**. v. 294, p. 1024–1030, 2001.

GURIDI, J.; OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; LOZANO, A.A.; MANRIQUE, M. L-dopa-induced dyskinesia and stereotactic surgery for Parkinson's disease. **Neurosurgery**., v. 62, n. 2, p. 311-23, 2008.

HALLETT, P.J.; DUNAH, A.W.; RAVENSCROFT, P.; ZHOU, S.; BEZARD, E.; CROSSMAN, A.R.; BROTCHE, J.M.; STANDAERT, D.G. Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**., v. 48, n. 4, p. 503-16, 2005.

HAN SOO YOO , YONG HO CHOI, SEOK JONG CHUNG , YANG HYUN LEE, BYOUNG SEOK YE , YOUNG H. SOHN, JONG-MIN LEE & PHIL HYU LEE Cerebellar connectivity in Parkinson's disease with levodopa-induced dyskinesia **Annals of Clinical and Translational Neurology** 2019; 6(11): 2251–2260

HELY, M. A.; MORRIS, J. G.; REID W. G.; TRAFFICANTE, R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-DOPA-responsive problems dominate at 15 years. **MovDisord**, v. 20, p. 190–199, 2005.

HEUMANN, R.; MORTALLA, R.; HERRERO, M. T.; CHAKRABARTY, K. *et al.*. Dyskinesia in Parkinson's disease: mechanisms and current non-pharmacological interventions. **J. Neurochem**. v. 130, p. 472–489, 2014.

HUOT, P. L-DOPA-induced dyskinesia, is striatal dopamine depletion a requisite? **J Neurol Sci.**, v. 351, n. 1-2, p. 9-12, 2015.

HUOT, P.; JOHNSTON, T. H.; KOPRICH, J. B.; FOX, S. H.; BROTCHE, J. M. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Pharmacol rev.**, v. 65,

p. 171–222, 2013.

IDERBERG, H.; MCCREARY, A.C.; VARNEY, M.A.; KLEVEN, M.S.; KOEK, W.; BARDIN, L.; DEPOORTÈRE, R.; CENCI, M.A.; NEWMAN-TANCREDI, A. NLX-112, a novel 5-HT_{1A} receptor agonist for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia: Behavioral and neurochemical profile in rat. **Exp Neurol.**, v. 271, p. 335-50, 2015.

INOUE, K.; NAKAZAWA, K.; WATANO, T.; OHARA-IMAIZUMI, M.; FUJIMORI, K.; TAKANAKA, A. Dopamine receptor agonists and antagonists enhance ATP-activated currents. **Eur J Pharmacol**, v. 215, p. 321–324, 1992.

IRVANI, M. M.; JENNER, P. Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. **J Neural Transm.** v. 118, p. 1661–1690, 2011.

J.A. OBESO, MD, M. STAMELOU, MD, C.G. GOETZ, MD, W. POEWE, MD, A.E. LANG, MD, D. WEINTRAUB, MD Past, Present, and Future of Parkinson's Disease: A Special Essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy **Mov Disord.** 2017 September ; 32(9): 1264–1310

JAGMAG, S.A.; TRIPATHI, N.; SHUKLA, S.D.; MAITI, S.; KHURANA, S. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Front Neurosci.**, v. 9, p. 503, 1026.

JENNER, P. M. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature Reviews**, v. 9, p. 665-677, 2008.

JENNER, P. M. Wearing Off, dyskinesia, and the use of continuous drug delivery in Parkinson's disease. **NeurolClin**, v. 31, p. s17-35, 2013.

JIMENES-URBIETA, H.; GAGO, B.; RIVA, P.; DELGADO-ALVARADO, M.; MARIN, C.; RODRIGUESZ-OROZ, M. C. Dyskinesia and impulse control disorders in Parkinson's disease: From pathogenesis to potential therapeutic approaches. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 56, p. 294-314. 2015.

KATZENSCHLAGER, R.; LEES, A.J. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. **J Neurol.**, v. 249, p. II19-24, 2002.

KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; NATTERU, P.A.; SELVAKUMAR, G.P.; SAEED, D.; ZAHOOR, H.; ZAHEER, S.; IYER, S.S.; ZAHEER, A. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **J NeurolNeurosurg Spine.**, v. 1, n. 1, p. 1003, 2016.

KITA MASAHIRO, YASUHISA ANO , ASUKA INOUE & JUNKEN AOKI Identification of P2Y receptors involved in oleamide-suppressing inflammatory responses in murine microglia and human dendritic cells **Scientific RepoRts** | (2019) 9:3135

KO, W.K.; CAMUS, S.M.; LI, Q.; YANG, J.; MCGUIRE, S.; PIOLI, E.Y.; BEZARD, E. An evaluation of istradefylline treatment on Parkinsonian motor and cognitive deficits in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated macaque models. **Neuropharmacology**, v. 110, n. Pt A, p. 48-58, 2016.

KRAEMMER, J.; KOVACS, G.; PERJU-DUMBRAVA, L.; PIRKER, S.; TRAUB-WEIDINGER, T.; PIRKER, W. Correlation of striatal dopamine transporter imaging with post mortem substantianigra cell counts. **Mov.Disord.**, v. 29, p. 1767-1773, 2014.

KRUGEL, U.; KITTNER, H.; FRANKE, H.; ILLES, P. Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. **Synapse**, v. 47, p. 134–142, 2003.

KRUGEL, U.; KITTNER, H.; FRANKE, H.; ILLES, P. Stimulation of P2 receptors in the ventral tegmental area enhances dopaminergic mechanisms in vivo. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 1084–1093, 2001.

KRUGEL, U.; SPIES, O.; REGENTHAL, R.; ILLES, P.; KITTNER, H. P2 receptors are involved in the mediation of motivation-related behavior. **PurinergicSignal.**, v. 1, p. 21–29, 2004.

LANG, A.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. First of two parts. **NEnglJMed**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.

LAURIE ERB, CHEN CAO, DEEPA AJIT, AND GARY A. WEISMAN P2Y Receptors in Alzheimer's Disease **Biol Cell**. 2015 January

LEE, H.G.; WON, S.M.; GWAG,B.J.; LEE,Y.B. Microglial P2X7 receptor expressiisac accompanied by neuronal damagein the cerebral cortex of the APPs we/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. **Exp.Mol.Med.**, v.43, p. 7–14, 2011.

LEENTJENS, A.F. The role of dopamine agonists in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease: a systematic review. **Drugs.**, v.71, n. 3, p. 273-86, 2011.

LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, v. 14. p. 478-500. 2009.

LEWITT, P.A.; FAHN, S. Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. **Neurology.**, v. 86, p. S3-12, 2016.

LIMA, L.O.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA-SALMELA, L.F.; RODRIGUES-DE-PAULA, F. Work and power reduced in L-dopa naïve patients in the early-stages of Parkinson's disease. **ArqNeuropsiquiatr.**, v.74, n. 4, p. 287-92, 2016.

LOTIA, M.; JANKOVIC, J.New and emerging medical therapies in Parkinson's disease.**ExpertOpinPharmacother.**, v.17, n. 7, p. 895-909, 2016.

LUCA ANTONIOLI, CORRADO BLANDIZZI, PÁL PACHER, AND GYÖRGY HASKÓ
The Purinergic System as a Pharmacological Target for the Treatment of Immune-Mediated Inflammatory Diseases **Pharmacol Rev** 71:345–382, July 2019

LUNDBLAD, M.; USIELLO, A.; CARTA, M.; HAKANSSON, K.; FISONE, G.; CENCI, M. A.Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia.**Exp Neurol**. v. 194, n. 1, p. 66–75,2005.

LUNDBLAD, M; ANDERSSON, M.; WINKLER, C.; KIRIK, D.; WIERUP, N.; CENCI, M.

A. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**.v.15, p. 120-132, 2002.

MAEDA, T.; NAGATA, K.; YOSHIDA, Y.; KANNARI, K. Serotonergic hyperinnervation into the dopaminergic denervated striatum compensates for dopamine conversion from exogenously administered l-DOPA. **Brain Res.**, v. 1046, n. 1-2, p. 230-233, 2005.

MAGGIE HAM, MISA MIZUMORI, CHIKAKO WATANABE, JOON-HO WANG, TAKUYA INOUE, TAKANARI NAKANO, PAUL H. GUTH, ELI ENGEL, JONATHAN D. KAUNITZ, AND YASUTADA AKIBA Endogenous Luminal Surface Adenosine Signaling Regulates Duodenal Bicarbonate Secretion in Rats **JPET** 335:607–613, 2010

MAGRINELLI, F.; PICELLI, A.; TOCCO, P.; FEDERICO, A.; RONCARI, L.; SMANIA, N.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. **Parkinsons Dis.**, 2016.doi: 10.1155/2016/9832839.

MARIA P. ABBRACCHIO, GEOFFREY BURNSTOCK¹, JEAN-MARIE BOEYNAEMS, ERIC A. BARNARD, JOSÉ L. BOYER, CHARLES KENNEDY, GILLIAN E. KNIGHT, MARTA FUMAGALLI, CHRISTIAN GACHET, KENNETH A. JACOBSON, and GARY A. WEISMAN International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy **Pharmacol Rev.** 2006 September ; 58(3): 281–341

MARONGIU ROBERTA, MARGARITA ARANGO-LIEVANOVA, VERONICA FRANCARDOB, PETER MORGENSTERNA, XIAOQUN ZHANGC, M. ANGELA CENCIB, PER SVENNINGSSONC, PAUL GREENGARDD, AND MICHAEL G. KAPLITTA, Gene therapy blockade of dorsal striatal p11 improves motor function and dyskinesia in parkinsonian mice **PNAS** | February 2, 2016 | vol. 113 | no. 5 | 1423–1428

MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B.E.; MCGEER, E.G. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantianigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology.**, v. 38, n.8, p. 1285-91, 1988.

MEHDI ESHRAGHI¹, URI NIMROD RAMÍREZ-JARQUÍN¹, NEELAM SHAHANI¹, TOMMASO NUZZO, ARIANNA DE ROSA, SUPRIYA SWARNKAR¹, NICOLE GALLI¹, OSCAR RIVERA, GEORGE TSAPRAILIS, CATHERINA SCHARAGER-TAPIA, GOGCE CRYNEN⁵, QIN LI, MARIE-LAURE THIOLAT, ERWAN BEZARD, ALESSANDRO USIELLO, SRINIVASA SUBRAMANIAM RasGRP1 is a causal factor in the development of l-DOPA–induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2020

MENEZES, Ana Paula Fontenele. **Efeitos da curcumina e do resveratrol em ratos com parkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina: um estudo comportamental e neuroquímico.** 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MICHAEL L. MARTINI, SEAN N. NEIFERT, J MOCCO, FEDOR PANOV, WINONA TSE, RUTH H. WALKER, JIAN JIN, FIONA GUPTA Recent Advances in the Development of Experimental Therapeutics for Levodopa-Induced Dyskinesia **J Mov Disord** 2019;12(3):161-165

MIRZA, B.; HADBERG, H.; THOMSEN, P.; MOOS, T. The absence of reactive astrocytosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v.95, n. 2, p. 425-32, 2000.

MIZUNO, Y. Genetics of Parkinson's disease. **Biomed Pharmacother**, v. 53, p. 109-116, 1999.

MOGI, M.; HARADA, M.; KONDO, T.; RIEDERER, P.; INAGAKI, H.; MINAMI, M.; NAGATSU, T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **NeurosciLett.**, v. 180, n. 2, p. 147-50, 1994.

MORIGUCHI, S.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. **Journal of Neurochemistry.** v. 120, p.541-551, 2012.

MÜLLER, T.; TROMMER, I.; MUHLACK, S.; MUELLER, B.K. Levodopa increases oxidative stress and repulsive guidance molecule A levels: a pilot study in patients with Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 123, n. 4, p. 401-6, 2016.

NADJAR, A.; GERFEN, C.R.; BEZARD, E. Priming for l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a feature inherent to the treatment or the disease? **Prog.Neurobiol.**, v. 87, p. 1-9, 2009.

NAGATSU, T.; SAWADA, M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. **J Neural Transm Suppl.** v.72, p. 113-20, 2007.

NEVES, K.R.; NOBRE, H.V. JR.; LEAL, L.K.; DE ANDRADE, G.M.; BRITO, G.A.; VIANA, G.S. Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Parkinsons Dis.**, v. 2015, p. 108179, 2015.

NICOLA TAMBASCO, MICHELE ROMOLI AND PAOLO CALABRESI Levodopa in Parkinson's Disease: Current Status and Future Developments **Current Neuropharmacology**, 2018, 16, 1239-1252

NUTT, J. G.; GUNZLER, S.A.; KIRCHHOFF, T.; *et al.* Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and parkinsonism. **Movdisord.** v. 23, n. 13, p. 1860–1866, 2008.

OGAWA M, ZHOU Y, TSUJI R, KASAHARA J AND GOTO S (2019) Intrastratial Memantine Infusion Dampens Levodopa-Induced Dyskinesia and Motor Deficits in a Mouse Model of Hemiparkinsonism. **Front. Neurol.** 10:1258.

OLIVEIRA-GIACOMELLI Á, ALBINO CM, DE SOUZA HDN, CORRÊA-VELLOSO J, DE JESUS SANTOS AP, BARANOVA J AND ULRICH H (2019) P2Y6 and P2X7 Receptor Antagonism Exerts Neuroprotective/Neuroregenerative Effects in an Animal Model of Parkinson's Disease. **Front. Cell. Neurosci.** 13:476

OLIVEIRA-GIACOMELLI Á, NAALDIJK Y, SARDÁ-ARROYO L, GONÇALVES MCB, CORRÊA-VELLOSO J, PILLAT MM, DE SOUZA HDN AND ULRICH H (2018) Purinergic Receptors in Neurological Diseases With Motor Symptoms: Targets for Therapy. **Front. Pharmacol.** 9:325.

OUCHI, Y.; YOSHIKAWA, E.; SEKINE, Y.; FUTATSUBASHI, M.; KANNO, T.; OGUSU, T.; TORIZUKA, T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. **Ann Neurol.**, v. 57, n. 2, p. 168-75, 2005.

PADOVAN-NETO, F. E.; ECHEVERRY, M. B.; TUMAS, V.; DEL-BEL, E. A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesia in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, p. 927-935, 2009.

PADOVAN-NETO, F.E.; FERREIRA, N.R.; DE OLIVEIRA-TAVARES, D.; DE AGUIAR, D.; DA SILVA, C.A.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. **NeurosciLett.**, v. 541, p. 126-31, 2013.

PAL, R.; MIRANDA, M.; NARAYAN, M. Nitrosative stress-induced Parkinsonian Lewy like aggregates prevented through polyphenolic phytochemical analog intervention. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 404, p. 324–329. 2011.

PALERMO, S.; BASTOS, I. C.C.; MENDES, M.F.X.; TAVARES, E.F.T.; SANTOS, D.C.L.; RIBEIRO, A.F. C. Avaliação e intervenção fonoaudiológica na doença de Parkinson. Análise clínica-epidemiológica de 32 pacientes. **Rev Bras Neurol**, v. 45, n. 4, p. 17-24, 2009.

PARK, B.; YANG, J.; YUN, N.; CHOE, K.M.; JIN, B.K.; OH, Y.J. Proteomic analysis of expression and protein interactions in a 6-hydroxydopamine-induced rat brain lesion model. **Neurochem Int.**, v. 57, n. 1, p. 16-32, 2010.

PAVÓN, N.; MARTÍN, A.B.; MENDIALDUA, A.; MORATALLA, R. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 64–74, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, London, 1986. In press.

PÉCHEVIS, M.; CLARKE, C. E.; VIEREGGE, P.; KHOSHNOOD, B.; DESCHASEAUX-VOINET, C.; BERDEAUX, G.; ZIEGLER, M. Trial Study Group. Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective. **European study. Eur J Neurol**, v. 12, p. 956–963, 2005.

PEGGY RENTSCH1, SANDY STAYTE, GARY P. MORRIS AND BRYCE VISSSEL Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on l-Dopa induced dyskinesia. **BMC Neuroscience**, 2019

PENG Q, ZHONG S, TAN Y, ZENG W, WANG J, CHENG C, YANG X, WU Y, CAO X AND XU Y (2019) The Rodent Models of Dyskinesia and Their Behavioral Assessment. **Front. Neurol.** 10:1016.

PERESE, D. A.; ULMAN, J.; VIOLA, J.; EWING, S. E.; BANKIEWICZ, K.S.A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model.**Brain Research.** v. 494, p. 285-293. 1989.

PICCONI, B.; CENTONZE, D.; HÅKANSSON, K.; BERNARDI, G.; GREENGARD, P.; FISONE, G.; CENCI, M.A.; CALABRESI, P. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Neurosci.**, v. 6, n. 5, p. 501-506, 2003..

PICCONI, B.; CENTONZE, D.; HÅKANSSON, K.; et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia.**Nat Neurosci.** v. 6, p. 501–506, 2003.

PINNA, A.; KO, W.K.; COSTA, G.; TRONCI, E.; FIDALGO, C.; SIMOLA, N.; LI, Q.; TABRIZI, M.A.; BEZARD, E.; CARTA, M.; MORELLI, M. Antidyskinetic effect of A2A and 5HT1A/1B receptor ligands in two animal models of Parkinson's disease. **MovDisord.**, v. 31, n. 4, p. 501-511, 2016.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, TD. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **MovDisord**, v. 29, n. 13, p. 1583–90. 2014.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism RelatDisord**, v. 11, p. 3-7, 2005.

PUCHAŁOWICZ, K.; TARNOWSKI, M.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; CHLUBEK, D.; DZIEDZIEJKO, V. P2X and P2Y receptors—role in the pathophysiology of the nervous system.**Int J Mol Sci.**, v. 15, n. 12, p. 23672-704, 2014.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines.**Pharmacol Rev.**, v. 50, n. 3, p. 413-92, 1998.

REN, T.; YANG, X.; WU, N.; CAI, Y.; LIU, Z.; YUAN, W. Sustained-release formulation of levodopa methyl ester/benserazide for prolonged suppressing dyskinesia expression in 6-OHDA-leisoned rats. **NeurosciLett.** v. 502, p. 117–122, 2011.

RENTSCH PEGGY, SANDY STAYTE, GARY P. MORRIS AND BRYCE VISSEL Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on l-Dopa induced dyskinesia **BMC Neurosci** (2019) 20:5

RINGENDAHL, H.; SIERLA, T. Freezing phenomenon in Parkinson disease. **Fortschr Neurol Psychiatr.**, v. 65, n. 10, p. 435-45, 1997.

ROBELET, S.; MELON, C.; GUILLET, B.; SALIN, P.; KERKERIAN-LE, G. L. Chronic LDOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 20, p. 1255–1266, 2004.

RODRIGUES, R.J.; TOMÉ, A.R.; CUNHA, R.A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. **Front Neurosci.**, v. 9, p. 148, 2015.

ROSIN, D.L.; HETTINGER, B.D.; LEE, A.; LINDEN, J. Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. **Neurology**, v.61, n. 11, p. S12-S18, 2003.

ROUSSAKIS ANDREAS-ANTONIOS , MARTA GENNARO, NICHOLAS P. LAO-KAIMI, DAVID TOWEY, PAOLA PICCINI, Dopamine Transporter Density in *de novo* Parkinson's Disease Does Not Relate to the Development of Levodopa-Induced Dyskinesias **J Neuroinflamm Neurodegener Dis.** 2019 ; 3(1):

RYU, J.K.; MCLARNON, J.G. Block of purinergic P2X7 receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 19, p. 1715–1719, 2008.

SACNITÉ ALBARRÁN-BRAVO, JOSÉ ARTURO ÁVALOS-FUENTES, HERNÁN CORTÉS , MARINA RODRIGUEZ-SÁNCHEZ , NORBERTO LEYVA-GARCÍA , CLAUDIA RANGEL-BARAJAS , DAVID ERLIJ AND BENJAMÍN FLORÁN Severity of Dyskinesia and D3R Signaling Changes Induced by L-DOPA Treatment of Hemiparkinsonian Rats Are Features Inherent to the Treated Subjects. **Biomolecules** 2019, 9, 431

SANTINI, E.; VALJENT, E.; USIELLO, A.; CARTA, M.; BORGKVIST, A.; GIRAULT, J. A.; HERVE, D.; GREENGARD, P.; FISONE, G. Critical involvement of amp/darpp-32 and

extracellular signal-regulated proteinkinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. **J. Neurosci.** v. 27, p. 6995–7005, 2007.

SCHMUED, L.C.; STOWERS, C.C.; SCALLET, A.C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res.**, v. 1035, n. 1, p. 24–31, 2005.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.** v. 318, p.215–224. 2004.

SE JOON CHOI, THONG C MA, YUNMIN DING, TIMOTHY CHEUNG, NEAL JOSHI, DAVID SULZER, EUGENE V MOSHAROV, UN JUNG KANG Alterations in the intrinsic properties of striatal cholinergic interneurons after dopamine lesion and chronic L-DOPA. **eLife** 2020

SHUGUANG YUAN, H. C. STEPHEN CHAN, HORST VOGEL, SLAWOMIR FILIPEK, RAYMOND C. STEVENS, AND KRZYSZTOF PALCZEWSKI The Molecular Mechanism of P2Y1 Receptor Activation **Angew. Chem. Int. Ed.** 2016, 55, 10331 –10335

SKAPER, S.D.; FACCI, L.; CULBERT, A.; CHESSELL, I.; DAVIS, J.B.; RICHARDSON, J.C. P2X7 receptors on microglial cells mediate toxicity to cortical neurons in vitro. **Society for Neuroscience**, v.54, n. 3, p. 234-42, 2005.

SOLÍS, O.; GARCIA-MONTES, J.R.; GONZÁLEZ-GRANILLO, A.; XU, M.; MORATALLA, R. Dopamine D3 Receptor Modulates l-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling. **Cereb Cortex.**, v. 27, n. 1, p. 435-446, 2017.

SONG, L.; ZHANG, Z.; HU, R.; CHENG, J.; LI, L.; FAN, Q.; WU, N.; GAN, J.; ZHOU, M.; LIU, Z. Targeting the D1-N-methyl-D-aspartate receptor complex reduces L-dopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson's rats. **Drug Des DevelTher.**, v. 10, p. 547-55, 2016.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 35, n. 10, p. 537-47, 2014.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. Supersensitivity of P2X receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia. **JNeurochem**, v. 95, n. 5, p. 1421-37, 2005.

STAMFORD, J.; SCHELLER, D.; JENNER, P. Parkinson's Inside Out. **JParkinsons Dis.**, v. 6, n. 1, p. 65-6, 2016.

STOCCHI, F.; TAGLIATI, M.; OLANOW, C. W. Treatment of levodopa induced motor complications. **MovDisord**, v. 23, n. 3, p. S599–S612, 2008.

STOOF, J.C.; KEBABIAN, J.W. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. **Nature.**, v. 294, n. 5839, p. 366-368, 1981.

TAKAO YASUHARA Neurobiology Research in Parkinson's Disease **Int. J. Mol. Sci.** 2020, 21, 793

TEIXEIRA, M.D.; SOUZA, C.M.; MENEZES, A.P.; CARMO, M.R.; FONTELES, A.A.; GURGEL, J.P.; LIMA, F.A.; VIANA, G.S.; ANDRADE, G.M. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. **PharmacolBiochemBehav.**, v. 110, p. 1-7, 2013.

TÓTH ADRIÁN, ZSÓFIA ANTAL, DÁNIEL BEREZKI, BEÁTA SPERLÁGH Purinergic Signalling in Parkinson's Disease: A Multi-target System to Combat Neurodegeneration **Neurochemical Research** (2019) 44:2413–2422

TRAVIS A BABOLA¹, CALVIN J KERSBERGEN¹, HAN CHIN WANG^{1†}, DWIGHT E BERGLES Purinergic signaling in cochlear supporting cells reduces hair cell excitability by increasing the extracellular space **eLife** 2020;9:e52160

TRONCI, E.; FIDALGO, C.; ZIANNI, E.; COLLU, M.; STANCAMPIANO, R.; MORELLI, M.; GARDONI, F.; CARTA, M. Effect of memantine on L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 265, p. 245-52, 2014.

TRONCI, E.; LISCI, C.; STANCAMPIANO, R.; FIDALGO, C.; COLLU, M.; DEVOTO, P.; CARTA, M. 5-Hydroxy-tryptophan for the treatment of L-DOPA induced dyskinesia in the rat Parkinson's disease model. **Neurobiology of Disease.** v. 60, p. 108–114, 2013.

TYSNES, O.B.; STORSTEIN, A.; Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**. 2017. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y.

UCHIDA, S.; TASHIRO, T.; KAWAI-UCHIDA, M.; MORI, A.; JENNER, P.; KANDA, T. Adenosine A_{2A}-receptor antagonist istradefylline enhances the motor response of L-DOPA without worsening dyskinesia in MPTP-treated common marmosets. **J.Pharmacol.Sci.**, v. 124, n. 4, p. 480-485, 2014.

UNGERSTEDT U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol**. v. 5, p.107–110, 1968.

WANG W-W, ZHANG X-R, LIN J-Y, ZHANG Z-R, WANG Z, CHEN S-Y, AND XIE C-L (2019) Levodopa/Benserazide PLGA Microsphere Prevents L-Dopa-Induced Dyskinesia via Lower β -Arrestin2 in 6-Hydroxydopamine Parkinson's Rats. **Front. Pharmacol**. 10:660.

WANG, Y.C.; CUI, Y.; CUI, J.Z.; SUN, L.Q.; CUI, C.M.; ZHANG, H.A.; ZHU, H.X.; LI, R.; TIAN, Y.X.; GAO, J.L. Neuroprotective effects of brilliant blue G on the brain following traumatic brain injury in rats. *Mol Med Rep.*, v. 12, n. 2, p. 2149-54, 2015.

WICTORIN, K.; WIDNER, H. Memantine and reduced time with dyskinesia in Parkinson's Disease. **Acta Neurol Scand.**, v. 133, n. 5, p. 355-60, 2016.

WIRKNER, K.; KÖFALVI, A.; FISCHER, W.; GÜNTHER, A.; FRANKE, H.; GRÖGER-ARNDT, H.; NÖRENBERG, W.; MADARÁSZ, E.; VIZI, E.S.; SCHNEIDER, D.; XIONG, Y.; ZHANG, Y.; IQBAL, J.; KE, M.; WANG, Y.; LI, Y.; QING, H.; DENG, Y.G *et al.*. Differential expression of synaptic proteins in unilateral 6-OHDA lesioned rat model-A comparative proteomics approach. **Proteomics.**, v. 14, n.15, p. 1808-1819, 2014.

YANG, X.; ZHENG, R.; CAI, Y.; LIAO, M.; YUAN, W.; LIU, Z. Controlled-release levodopa methyl ester/benserazide-loaded nanoparticles ameliorate levodopa-induced dyskinesia in rats. **Int J Nanomedicine.**, v. 7, p. 2077-86, 2012.

YOU DIM, M.B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.

ZHANG, Y. X.; YAMASHITA, H.; OHSHITA, T.; SAWAMOTO, N.; NAKAMURA, S. ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum. **Brain Res**, v. 691, p. 205–212, 1995.

ZHANG, Y.; PATERSON, W.G. Excitatory purinergic neurotransmission in smooth muscle of guinea-pig [corrected] taeniacaeci. **J Physiol.**, v. 563, n. Pt 3, p. 855-65, 2005.

ZHOU, M. Z.; LIU, Z. G.; GAN, J.; CHEN, W.; LU, L. X.; WU, J. Y. Neuropsychiatric problems in patients with Parkinson's disease. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, v. 88, n. 21, p. 1442-5, 2008.

ZHUANG, X., BELLUSCIO, L., HEN, R. G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. **J Neurosci**, v. 20, n. 16, p. 91, 2000.