

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
INSTITUTO INTEGRADO DE SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

LILLIAN ARAUJO NOGUEIRA  
MARIA EDUARDA DE SOUZA REZENDE

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE ACETILCOLINA E DOPAMINA  
SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR EM UM MODELO ANIMAL DA  
DOENÇA DE PARKINSON.**

CAMPO GRANDE, MS  
2024

LILLIAN ARAUJO NOGUEIRA  
MARIA EDUARDA DE SOUZA REZENDE

**ANÁLISE DA INTERAÇÃO ENTRE ACETILCOLINA E DOPAMINA  
SOBRE O COMPORTAMENTO MOTOR EM UM MODELO ANIMAL DA  
DOENÇA DE PARKINSON.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Fisioterapia, do Instituto Integrado de Saúde, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de bacharel em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Albert Schiaveto de Souza.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Me. Érica de Moraes Santos Corrêa.

CAMPO GRANDE, MS  
2024



## ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Ao dia 12 de novembro de 2024, reuniu-se nas dependências do Campus Universitário da UFMS, no INISA, Bloco 12, sala 05, a banca examinadora composta pelos professores: Albert Schiaveto de Souza (Orientador), Gustavo Christofolletti (Examinador 1) e Maria Lua Marques de Mendonça (Examinador 2), para a defesa pública do Trabalho de Conclusão de Curso em Fisioterapia da UFMS intitulado: "**Análise Da Interação Entre Acetilcolina E Dopamina Sobre O Comportamento Motor Em Um Modelo Animal Da Doença De Parkinson**" das alunas **Lillian Araujo Nogueira e Maria Eduarda de Souza Rezende**. Após a exposição oral, as alunas foram arguidas pelos componentes da banca que se reuniram reservadamente, e decidiram pela:

( X ) APROVAÇÃO

( ) REPROVAÇÃO

Para constar, eu Albert Schiaveto de Souza (Orientador), redigi a presente Ata, que após aprovada será assinada pelos demais membros da banca.

Campo Grande, 12 de novembro de 2024

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Christofolletti, Professor do Magisterio Superior**, em 12/11/2024, às 14:38, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Albert Schiaveto de Souza, Professor do Magisterio Superior**, em 12/11/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA  
MÁXIMA  
NO MEC

UFMS  
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Maria Lua Marques de Mendonça, Usuário Externo**, em 14/11/2024, às 10:23, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **5243075** e o código CRC **6C1EACF9**.

**INSTITUTO INTEGRADO DE SAÚDE**

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

---

**Referência:** Processo nº 23104.032426/2024-45

SEI nº 5243075

A Deus por nos colocar nessa jornada.  
A nossa família por dar todo suporte que  
precisávamos.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS/MEC-Brasil.

Eu, Lillian Araujo Nogueira, agradeço o apoio e incentivo de pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com esta jornada. Agradeço aos meus pais e a minha vó, pelo amor, compreensão e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida acadêmica. Vocês são minha inspiração diária e me mostraram a importância da perseverança e do trabalho árduo. Aos meus amigos e familiares, pela compreensão das ausências e pela paciência ao me escutarem quando mais precisei.

Eu, Maria Eduarda de Souza Rezende, agradeço primeiramente a Deus por me colocar nessa caminhada, ser meu suporte, meu guia e meu aliado nas horas mais difíceis. A minha família, em especial minha mãe, mulher guerreira e inspiradora que sempre me apoiou nas decisões importantes, por ser meu amparo nas adversidades, quem me escuta quando preciso e que nunca duvidou da minha jornada, sem a senhora eu nada seria. Ao meu pai, tios e primos que abraçaram essa trajetória com muito amor e carinho. Aos meus amigos por tornarem tudo mais fácil quando as coisas pareciam sair do controle, por serem meus parceiros e por me encorajarem dia após dia. Preciosa e prazerosa foi esta etapa na qual eu concluo, nada disso seria possível sem vocês. Meus sinceros agradecimentos.

Ambas agradecemos ao professor Albert Schiaveto de Souza e a mestrandia Erica de Moraes Santos Corrêa, pela orientação paciente, pelas críticas construtivas e por acreditar no potencial deste trabalho. Suas dedicações e empenhos foram fundamentais para o desenvolvimento deste projeto, e o conhecimento transmitido sempre será lembrado.

Aos nossos amigos e colegas de curso, que compartilharam essa caminhada e nos apoiaram em todos os desafios. Nossa troca de ideias, risadas e apoio mútuo tornaram esta jornada muito mais leve e agradável.

Por fim, agradecemos a todos os professores e colaboradores que, de alguma forma, contribuíram para o nosso aprendizado e crescimento durante essa jornada acadêmica. A cada um de vocês, nosso sincero muito obrigado.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do antagonista dos receptores muscarínicos M4 de acetilcolina, PCS1055 dihydrochloride, na catalepsia e nas alterações do comportamento locomotor de camundongos, induzidas pelo haloperidol, um antagonista dos receptores de dopamina, e pelo L-NOARG, um inibidor da sintase do óxido nítrico. Foram realizados dois experimentos com seis grupos, cada um contendo oito camundongos suíços, machos, pesando entre 20-30g. No Experimento I, os animais receberam injeção intraperitoneal (I.P.) de salina ou haloperidol (2 mg/kg), seguida pela administração I.P. de salina ou de PCS1055 dihydrochloride (2,5 e 10mg/kg) após 30 minutos. No Experimento II, os animais receberam injeção I.P. de salina ou L-NOARG (40mg/kg), seguida pela aplicação I.P. de salina ou de PCS1055 dihydrochloride (2,5 e 10mg/kg) após 30 minutos. Após 30, 60 e 90 minutos da administração das drogas, os animais foram submetidos ao teste de catalepsia na barra e, após 60 minutos, ao teste de Campo Aberto. A análise do efeito do grupo, do momento e da interação entre os fatores, em relação ao tempo de catalepsia, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey. A comparação entre os grupos experimentais em relação à quantidade de comportamentos de exploração horizontal e vertical, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. No Experimento I, os animais que receberam haloperidol apresentaram maior tempo de catalepsia em relação àqueles que receberam salina como primeira droga (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Além disso, no tempo de 90 minutos, PCS1055 dihydrochloride, em ambas as doses, potencializou o efeito cataléptico do haloperidol. PCS1055 dihydrochloride também intensificou as alterações motoras do haloperidol, especificamente em relação à exploração horizontal dos animais (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). No experimento II, o L-NOARG induziu catalepsia e alterações locomotoras nos animais (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ), que não foram revertidas pela aplicação de PCS1055 dihydrochloride em nenhum dos momentos analisados no teste de catalepsia e no teste do campo aberto. Adicionalmente, PCS1055 dihydrochloride, na dose de 2,5 mg/kg, por si só (Salina+PCS1055 dihydrochloride) levou à hipolocomoção e diminuição da exploração vertical dos animais no teste do campo aberto (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Dessa forma, o PCS1055 teve um efeito totalmente oposto ao esperado,

em relação à reversão da catalepsia e às alterações do comportamento exploratório dos animais no Campo Aberto, induzidas tanto pelo haloperidol, como pelo L-NOARG.

**Descritores:** Núcleos da Base; Receptores de Acetilcolina; Catalepsia; Dopamina.



## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the muscarinic M4 acetylcholine receptor antagonist, PCS1055 dihydrochloride, on catalepsy and changes in locomotor behavior in mice, induced by haloperidol, a dopamine receptor antagonist, and by L-NOARG, a nitric oxide synthase inhibitor. Two experiments were conducted with six groups, each containing eight male Swiss mice weighing between 20-30g. In Experiment I, the animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of saline or haloperidol (2 mg/kg), followed by i.p. administration of saline or PCS1055 dihydrochloride (2.5 and 10 mg/kg) after 30 minutes. In Experiment II, the animals received an i.p. injection of saline or L-NOARG (40 mg/kg), followed by i.p. administration of saline or PCS1055 dihydrochloride (2.5 and 10 mg/kg) after 30 minutes. At 30, 60, and 90 minutes after drug administration, the animals underwent the bar catalepsy test, and after 60 minutes, the Open Field test. Analysis of the effect of group, time, and the interaction between factors on catalepsy duration was performed using two-way repeated-measures ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. Comparison among experimental groups regarding the amount of horizontal and vertical exploratory behaviors was conducted using one-way ANOVA, followed by Tukey's post hoc test. In Experiment I, animals that received haloperidol showed a longer catalepsy duration compared to those that received saline as the first drug (Tukey post hoc test,  $p < 0.05$ ). Additionally, at the 90-minute time point, PCS1055 dihydrochloride, at both doses, potentiated the cataleptic effect of haloperidol. PCS1055 dihydrochloride also intensified the motor changes induced by haloperidol, specifically in terms of the horizontal exploration of the animals (Tukey post hoc test,  $p < 0.05$ ). In Experiment II, L-NOARG induced catalepsy and locomotor changes in the animals (Tukey post hoc test,  $p < 0.05$ ), which were not reversed by the administration of PCS1055 dihydrochloride at any analyzed time points in the catalepsy test and the Open Field test. Additionally, PCS1055 dihydrochloride at a dose of 2.5 mg/kg alone (Saline + PCS1055 dihydrochloride) led to hypolocomotion and reduced vertical exploration in the Open Field test (Tukey post hoc test,  $p < 0.05$ ). Thus, PCS1055 had an effect completely opposite to that expected in terms of reversing catalepsy and changes in exploratory behavior in the Open Field test induced by both haloperidol and L-NOARG.

**Descriptors:** basal ganglia, acetylcholine receptors, catalepsy, dopamine.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. JUSTIFICATIVA.....	16
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Tipo, local e período da pesquisa.....	18
4.2 Amostra e critérios de inclusão.....	18
4.3 Organização e análise dos dados.....	18
4.3.1 Drogas.....	18
4.3.2 Experimentos e grupos experimentais.....	18
4.3.2.1 Experimento I: Efeito da PCS1055 dihydrochloride nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol.....	19
4.3.2.2 Experimento II: Efeito da PCS1055 dihydrochloride nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NOARG.....	19
4.3.3 Avaliação funcional dos animais.....	20
4.3.3.1 Teste de catalepsia na barra.....	20
4.3.3.2 Teste do campo aberto.....	20
4.3.4 Análise estatística.....	21
4.4 Aspectos éticos.....	21
5. RESULTADOS.....	23
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	21
<b>ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso dos Animais.....</b>	<b>28</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP), é uma doença neurodegenerativa, onde ocorre perda progressiva de células nervosas (neurônios), predominantemente as que estão localizadas em uma área específica do cérebro chamada substância negra, que tem esse nome devido a coloração escura das células produtoras de dopamina, uma substância responsável pela comunicação entre as células nervosas, e que participa de muitos processos, entre eles o planejamento e a coordenação de movimentos. (Michael J Fox Foundation, 2020; Parkinson's Foundation, 2020; Organização Pan-Americana da Saúde, 2018).

A DP é primariamente uma doença da função motora extrapiramidal, causada por degeneração severa de neurônios dopaminérgicos da substância nigra. O tratamento corrente da DP está baseado na terapia dopaminérgica, visando reverter os efeitos da depleção de dopamina estriatal induzida pela destruição da via nigro-estriatal (Cerri, 2020; Bougea *et al.*, 2019; Pontone *et al.*, 2022).

O tratamento sintomático da DP com L-dopa e drogas agonistas de dopamina predominam a terapia farmacológica e são altamente efetivos em tratar os estágios iniciais da doença. Todavia, com a introdução de drogas dopaminérgicas associam-se efeitos colaterais adversos, tais como náusea, vômito e hipotensão, além de uma série de complicações relacionadas ao tratamento a longo prazo, as quais aumentam em severidade com a progressão da doença. Além disso, as demais terapias utilizadas atualmente tratam os sintomas neuromotores e não modificam significativamente a progressão da doença. Como consequência disso, há a necessidade do desenvolvimento de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP com novas manipulações capazes de produzir agentes com ação anti-parkinsonianas em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de discinesias (Kanda; Jenner, 2020).

Alguns estudiosos defendem que a levodopa (L-DOPA) e outras drogas antiparkinsonianas auxiliam no desenvolvimento frequente de psicose. Entretanto esta fisiopatologia já foi reconhecida como inerente ao processo do desenvolvimento da DP, mesmo antes da introdução terapêutica de drogas antiparkinsonianas (Ferreira-Junior *et al.*, 2020). Apesar de ter efeitos colaterais, como a hipotensão postural, náuseas e vômitos, a L-DOPA é considerada uma droga antiparkinsoniana

segura e eficaz no tratamento dos sintomas motores da DP. Isso, antes do desenvolvimento de complicações motoras incapacitantes, como a discinesia induzida e/ou infarto agudo do miocárdio (Anjos *et al.*, 2021).

Atualmente, acredita-se que os anticolinérgicos tenham mais efeitos colaterais do que outras drogas antiparkinsonianas, principalmente com respeito a sintomas cognitivos e neuropsiquiátricos. Também é relatado um melhor efeito terapêutico deste tipo de medicação, predominantemente, nas formas clínicas de tremor. Como uma consequência do seu efeito antimuscarínico periférico, a terapia anticolinérgica é contraindicada em pacientes com glaucoma de ângulo fechado, taquicardia, hipertrofia prostática, obstrução gastrointestinal e megacólon. Pode também causar borramento visual com dificuldade de acomodação, retenção urinária, náusea, etc. Todos estes efeitos são mais frequentes em idosos ou em pacientes com distúrbios cognitivos associados. Portanto, o uso de anticolinérgicos é contraindicado em pacientes com demência associada (Lattanzi *et al.*, 2018).

O estudo de novas terapias para a DP está voltado para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos basais que vão além das vias nigro-estriatais lesionadas (Leta, 2019). Vários agentes apresentando um potencial terapêutico têm sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores glutamatérgicos, canabinóides, opióides,  $\alpha$ 2-adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos (Kanda; Jenner, 2020).

O estriado, onde os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos interagem, é a estrutura fundamental dos núcleos da base do encéfalo, envolvido em alterações fisiopatológicas subjacentes à DP. Os resultados atuais mostram que a transmissão colinérgica alterada via M1 e M4 do estriado dorsal desempenha um papel fundamental na ocorrência de sintomas motores na DP (Felder, 2018). O desequilíbrio da transmissão de acetilcolina e dopamina no sistema nigro-estriatal é a base patogênica das desordens extrapiramidais, como no caso da DP. De acordo com a clássica hipótese clínica, a diminuição da atividade do sistema dopaminérgico é paralela à hiperfunção do sistema colinérgico (Dagaev *et al.*, 2004).

Atualmente, está claro que a liberação de acetilcolina depende de um controle inibitório contínuo de dopamina, mediante sua ação sobre os receptores de dopamina do tipo D2, presentes nos interneurônios colinérgicos. A diminuição da atividade dopaminérgica resulta no aumento da liberação de acetilcolina e, portanto,

no excesso de estimulação dos receptores muscarínicos do estriado (Góngora-Alfaro *et al.*, 2005).

Os receptores muscarínicos de acetilcolina pertencem à família de receptores acoplados à proteína G. Cinco subtipos de receptores muscarínicos foram clonados: M1, M2, M3, M4, M5, e estão subdivididos em duas classes distintas: M1, M3 e M5 estão ligados a via proteína G para ativar a fosfolipase-C e mobilizar o cálcio intracelular; M2 e M4 estão ligados à proteína G para inibir a adenilato ciclase reduzindo a concentração de cAMP intracelular (Moran; Maksymetz; Conn, 2019).

No SNC, os receptores muscarínicos subtipo M1 estão localizados no córtex, hipocampo, estriado e tálamo, encontrados nos axônios pós-sinápticos, M2 encontram-se predominantemente no tálamo, córtex, hipocampo e estriado, nos terminais sinápticos colinérgicos, M3 encontram-se no córtex e hipocampo, M5 localizam-se muito discretamente na substância nigra (Moran; Maksymetz; Conn, 2019). Em particular, o subtipo M4 tem sido encontrado em muitas regiões do cérebro, incluindo córtex e hipocampo, porém, em abundância no estriado, desempenhando papel importante no controle motor e no controle da liberação de dopamina (Moran; Maksymetz; Conn, 2019).

Em um estudo de imunoprecipitação revelou-se que 45% dos receptores muscarínicos do estriado são do subtipo M4 (Karasawa; Taketo; Matsui, 2003). Imunohistoquimicamente foi detectado 92% de receptores muscarínicos M4 nos neurônios estriatonigral, demonstrando que os neurônios estriatonigral co-expressam receptores muscarínicos M4 e receptores de dopamina D1 (Ince, Cilax; Levey, 1997).

Estes dois receptores desempenham papéis opostos no metabolismo de cAMP. A estimulação dos receptores de dopamina D1 ativam a adenilato ciclase, via proteína G, e a estimulação dos receptores muscarínicos M4 inibem a atividade enzimática, via proteína G, sugerindo o equilíbrio de acetilcolina-dopamina que reflete os efeitos neutralizantes desses neurotransmissores a nível de cAMP (Thomsen, Sørensen, Dencker, 2018)

Antagonistas não seletivos de receptores muscarínicos de acetilcolina são utilizados há vários anos como drogas anti-parkinsonianas (Pardo *et al.*, 2020). Evidências experimentais sugerem as propriedades anti-parkinsonianas de alguns antagonistas muscarínicos de acetilcolina, como a escopolamina, antagonista

muscarínico de acetilcolina com maior afinidade com o receptor tipo M1, ao reduzir catalepsia induzida por haloperidol em camundongos (Haraguchi *et al.*, 1997).

No entanto, com a abundância de receptores M4 encontrados no estriado, e por estar demonstrado seu importante papel na função motora, supõe-se que antagonistas de receptores muscarínicos M4 poderiam também ser úteis na restauração do equilíbrio entre dopamina e acetilcolina e, portanto, serem utilizados como tratamento na DP (Pardo *et al.*, 2020; Moran; Maksymetz; Conn, 2019).

Um estudo onde pilocarpina, agonista do receptor muscarínico tipo M3 de acetilcolina, gerou tremores em ratos, sugere que a ação central de antagonistas muscarínicos M4 poderiam ser utilizados como tratamento de Parkinson (Mayorga *et al.*, 1999).

O receptor muscarínico humano M4 pertence à subfamília classe A dos receptores acoplados à proteína G. A M4 emergiu como um alvo atraente para o tratamento da doença de Alzheimer e esquizofrenia, e resultados recentes mostraram que a transmissão colinérgica mediada pelo M4 está relacionada a sintomas motores na DP. (Wang *et al.*, 2020)

A acetilcolina liberada de interneurônios colinérgicos, que atuam através de receptores de nicotínica e muscarínica no estriado, têm sido considerada central para a potente regulação colinérgica da atividade dos núcleos basais e comportamentos motores. A ativação da acetilcolina através de receptores muscarínicos tem múltiplas ações para impedir a liberação da dopamina, a sinalização e aos comportamentos motores relacionados. Os antagonistas de receptores muscarínicos possuem eficácia na redução dos sintomas motores em doenças onde a liberação ou sinalização da dopamina é diminuída, como na DP, mas a sua atividade é limitada por causa de efeitos adversos graves. Avanços recentes na compreensão tanto dos locais anatômicos de ação da acetilcolina quanto dos subtipos muscarínicos envolvidos na regulação da função dos núcleos basais, revelam que o subtipo M4 desempenha um papel central na regulação da sinalização e liberação da dopamina nos núcleos basais. Esses achados levantaram a possibilidade de que fontes de acetilcolina fora do estriado possa regular a atividade motora e que a atividade da M4 é um potente regulador de disfunção motora (Moehle; Conn, 2019).

Além disso, para investigar o papel dos receptores muscarínicos M4, foi comparada a resposta cataléptica induzida por haloperidol em camundongos com

vários tipos de receptores muscarínicos e em camundongos mutantes, estes apresentavam apenas receptores muscarínicos M4. A resposta cataléptica foi idêntica para os dois grupos, porém, a resposta do antimuscarínico escopolamina foi diferente entre os dois genótipos, abolindo catalepsia induzida por haloperidol nos camundongos com tipos variados de receptores. Em contraste, o efeito anti-cataléptico da escopolamina nos camundongos mutantes foi fraca, sugerindo que o efeito anti-cataléptico de agentes antimuscarínicos, depende do bloqueio do receptor muscarínico M4 (Thomsen, Sørensen, Dencker, 2018).

Como os anticolinérgicos utilizados clinicamente não possuem seletividade particular pelos subtipos de receptores muscarínicos, aliado às fortes evidências do importante papel na função motora dos receptores muscarínicos M4, é necessário investigar a possível utilidade terapêutica de antagonistas muscarínicos seletivos a esse subtipo de receptores e seus efeitos em modelos animais (Betz *et al.*, 2007). Em contrapartida, o estudo recente tem mostrado que antagonistas não seletivos da adenosina podem ser úteis para o tratamento de sintomas motores e motivacionais. Evidências consideráveis indicam que os sistemas de adenosina e dopamina interagem na regulação da função dos gânglios da base. Os antagonistas demonstraram produzir efeitos antiparkinsonianos e antidepressivos em modelos animais. (Pardo *et al.*, 2020)

Estudos têm demonstrado forte afinidade de PCS1055 dihydrochloride por receptores muscarínicos M4. A PCS1055 dihydrochloride, antagonista de receptores muscarínicos que penetra facilmente na barreira hemato-encefálica, é um potente e seletivo antagonista competitivo do receptor muscarínico M4 da acetilcolina, que exibe uma seletividade 100 vezes sobre os receptores M1, M3 e M5 e uma seletividade 30 vezes no receptor M2.

A identificação de ligantes sintéticos seletivos para subtipos de receptores muscarínicos tem sido um desafio por meio da alta identidade de sequência e homologia estrutural entre os cinco receptores muscarínicos de acetilcolina. Estudos relatam a caracterização farmacológica da PCS1055, como um novo antagonista do receptor M4 muscarínico. Embora a potência de PCS1055 seja inferior à do antagonista pan-muscarínico atropina, ela tem melhor seletividade de subtipo em relação aos reagentes seletivos de M4, como as toxinas de peptídeo muscarínico (Santiago; Potter, 2001). Além disso, a análise de Schild indica que o PCS1055 atua como um antagonista competitivo para o receptor muscarínico M4 e confirma que a

afinidade do ligante é nanomolar baixa. Portanto, a PCS1055 representa um novo antagonista preferindo M4 que pode ser útil na elucidação dos papéis da sinalização do receptor M4.

No entanto, outros neurotransmissores, além de acetilcolina e dopamina, estão presentes nos núcleos da base e participam da modulação do comportamento. Entre eles, pode-se citar o óxido nítrico (NO), o qual tem de forma crescente sido reconhecido como um mensageiro inter e extracelular (Nowaczyk *et al.*, 2021). O NO tem efeitos neuronais como neurotransmissor e/ou neuromodulador tanto no sistema nervoso central como no periférico por mecanismos dependentes de cGMP (Bredt; Snyder, 1994; Nowaczyk *et al.*, 2021; Blom; Blute; Eldred, 2009). Os níveis mais elevados de NO em todo o organismo foram encontrados nos neurônios (Bredt, 1994).

O óxido nítrico é sintetizado a partir de duas vias, umas dessas sendo o NO é produzido a partir de L-arginina e do oxigênio em uma reação catalisada pelas NO sintases e é, subsequentemente, oxidado em nitrito e nitrato (Jones, 2021; Loureiro; Santos, 2017). A L-arginina é o único substrato para a produção de NO via NOS, sendo que esta produção ocorre através de complexas reações que envolvem co-substratos e cofatores além do oxigênio molecular (Szlas; Kurek; Krejpcio, 2022). Quando há redução de nitrato em nitrito, este é formado em óxido nítrico, ocorre aumento da sua concentração no sangue e nos tecidos, consequentemente assim sendo utilizado pelo organismo para diversas funções (Kapil *et al.*, 2020). Sendo estas, vasodilatação, angiogênese, respiração mitocondrial, biogênese mitocondrial, captação de glicose e manipulação do  $Ca^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (Jones, 2021)

Ativação de receptores NMDA é um estímulo pivô para a produção de NO em neurônios, em um processo dependente de  $Ca^{2+}$ -Calmodulina (Kiss; Vizi, 2001; Granzotto *et al.*, 2022; Nowaczyk *et al.*, 2021). Esse processo dependente se dá atividade do NO-sintase endotelial, regulada pela formação do complexo Cálcio-Calmodulina nas células endoteliais, que é facilitada pelo aumento da  $Ca^{2+}$  na célula (Nowaczyk *et al.*, 2021), sendo assim, este aumento pode se dar pela ação de agonistas, como a Acetilcolina (ACh), a histamina, além de estímulos físicos, como estresse (Valeev *et al.*, 2016). Além disso, o NO pode se difundir por distâncias relativamente grandes no tecido cerebral, é também hábil para regular a atividade sináptica (Kiss; Vizi, 2001; Granzotto *et al.*, 2022; Nowaczyk *et al.*, 2021).



Entre seus papéis extra-celulares, o NO tem sido mostrado regular a liberação de vários neurotransmissores, tais como aminoácidos, dopamina, acetilcolina e serotonina (Nowaczyk *et al.*, 2021). Na análise do comportamento, moduladores de NO exercem resultados incongruentes, como mostrado pelos efeitos similares produzidos tanto por aumento como por diminuição dos níveis de NO, observados em hiperlocomoção induzida por antagonistas de receptores NMDA (Bujas-Bobanovic *et al.*, 2000; Pitsikas, 2016), epilepsia, sono (Faradji *et al.*, 2000) e lesão cerebral (Liu *et al.*, 2023).

Tem sido demonstrado que inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) produzem catalepsia em camundongos (Del Bel, 2010) e em ratos (Cilic *et al.*, 2021; Iacopucci *et al.*, 2012), a qual é potencializada pela co-administração de haloperidol (Cavas; Navarro, 2002; Cilic *et al.*, 2021).

A interferência com a formação do NO também pode produzir déficits em outros testes motores. Inibidores da NOS diminuem a locomoção e exploração vertical de camundongos no teste do campo aberto (Del Bel *et al.*, 2002) e a atividade motora espontânea de ratos (Halcaç *et al.*, 2000). Os inibidores da NOS, L-NOARG e 7-NI suprimem a atividade locomotora induzida por agonistas de receptores dopaminérgicos D1 e D2 (Starr; Starr, 1995). Estes autores levantaram a hipótese que a atividade contínua ou tônica da NOS constitutiva seria necessária para ocorrerem movimentos normais do corpo. A administração sistêmica de antagonistas de receptores da dopamina do tipo D1 diminui a atividade da NADPH-d em neurônios estriatais, enquanto que antagonistas de receptores do tipo D2 produzem o efeito oposto (Hoque; West, 2012).

Doadores de NO estimulam a liberação de acetilcolina em “slices” estriatais, ao passo que inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) diminuem os níveis de acetilcolina estriatal (Hanania; Johnson, 1998). Todavia, a interação entre NO e acetilcolina não está bem esclarecida ao nível do comportamento.

Assim, neste trabalho foi feita a proposta de avaliar o efeito de um antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina M4, na catalepsia induzida por inibidores de dopamina e de óxido nítrico. Além disso, estudamos as possíveis modificações no comportamento motor decorrentes da interação destes neurotransmissores, por meio do teste do Campo Aberto.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar a interação entre os neurotransmissores acetilcolina, dopamina e óxido nítrico nos núcleos basais de camundongos.

### **2.2 Objetivos específicos**

a) Avaliar o efeito de um antagonista de receptores muscarínicos de acetilcolina, PCS1055 dihydrochloride (mais seletivo para receptores tipo M4), no comportamento de catalepsia em camundongos, induzida por inibição de receptores de dopamina;

b) Avaliar o efeito de do PCS1055 dihydrochloride, no comportamento de catalepsia em camundongos, induzida por inibição da sintase do óxido nítrico;

c) Compreender a interação entre os neurotransmissores acetilcolina e dopamina e entre os neurotransmissores acetilcolina e óxido nítrico, sobre o comportamento motor de camundongos, especificamente em relação à exploração horizontal e vertical, por meio do teste do Campo Aberto.

### 3. JUSTIFICATIVA

A DP é o principal distúrbio da postura e do movimento encontrado na população idosa, perdendo apenas para os acidentes vasculares encefálicos. Estima-se de 85 a 187 casos por 100.000 pessoas, e sua incidência e prevalência aumenta nas faixas etárias mais avançadas. O início do quadro clínico ocorre geralmente entre 50 e 70 anos de idade, contudo, pode-se encontrar pacientes com início da doença em idades mais precoces. (Meneses *et al.*, 2003).

A DP é uma doença crônica, causada pela perda seletiva de neurônios dopaminérgicos localizados na pars compacta da substância nigra, determinando uma diminuição da neurotransmissão dopaminérgica no corpo estriado, em especial no putâmen. Seus sintomas característicos são o tremor de repouso, a rigidez muscular e a acinesia ou bradicinesia. (Shih *et al.*, 2006).

Teive (2005) destaca que pesquisas recentes têm demonstrado que a DP deve ser considerada como uma enfermidade neurodegenerativa, progressiva, com hipóteses etiológicas de origem genética e ambiental caracterizada pela presença de disfunção monoaminérgica múltipla, incluindo o déficit de sistemas dopaminérgicos, colinérgicos, serotoninérgicos e noradrenérgicos.

O tratamento corrente da DP está baseado na terapia dopaminérgica, visando reverter os efeitos da depleção de dopamina estriatal induzida pela destruição da via nigro-estriatal (Jankovic, 2002; Obeso *Et Al.*, 2000; Quinn, 1998).

Seu principal tratamento é a levodopa (L-dopa), considerado o agente farmacológico sintomático mais eficaz. No entanto seu uso contínuo apresenta declínio da eficácia terapêutica e surgem efeitos colaterais a longo prazo, como as flutuações motoras, as discinesias e os distúrbios neuro-psiquiátricos. (Júri, Chaná, 2006; Mattos, Mattos, 1999).

Com o objetivo principal de superar ou controlar as limitações do uso da L-dopa, foram introduzidos os agonistas dopaminérgicos, altamente efetivos em tratar os estágios iniciais da doença, mas não modificando significativamente a progressão da doença. Mas novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP devem produzir agentes com ação anti-parkinsoniana em todas as fases da doença, sem perda da eficácia da droga e que previna o surgimento de complicações. (Jenner, 2003; Júri, Chaná, 2006; Mattos, Mattos, 1999).

O estudo de novas terapias para a DP está voltado para sistemas não dopaminérgicos dentro dos núcleos da base que vão além das vias nigroestriatais lesionadas (Brotchie, 1998; Jenner, 2000). Vários agentes apresentando um potencial terapêutico têm sido descritos, incluindo agentes que atuam em receptores glutamatérgicos, canabinóides, opióides,  $\alpha$ 2-adrenérgicos e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos.

Conhecendo a importância do assunto, e os resultados dos estudos anteriormente citados, julga-se relevante a realização desta pesquisa. O melhor conhecimento da fisiologia dos núcleos da base e da fisiopatologia da DP, a alta incidência e prevalência da DP e o surgimento dos efeitos colaterais relacionados ao uso contínuo da terapia dopaminérgica justificam a realização desse estudo. Em um modelo animal, buscamos refletir ações anti-parkinsonianas de novos agentes, para que assim, possam ser produzidas novas manipulações farmacológicas capazes de apresentar um potencial terapêutico em todas as fases da doença, sem o declínio da eficiência e que possam também prevenir o surgimento de complicações.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Tipo, local e período da pesquisa**

Trata-se de uma pesquisa quantitativa, experimental, com coleta de dados primários, realizada no município de Campo Grande Mato Grosso do Sul, considerando o comportamento dos camundongos laboratoriais da raça SWISS oriundos do Biotério da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul em 2022/2023.

### **4.2 Amostra e critérios de inclusão**

A amostragem dos animais foi aleatória, com 96 animais. Neste experimento, foram utilizados camundongos suíços, machos, provenientes do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pesando entre 20-30 g. No laboratório, os animais foram alojados em grupo de até quatro animais e mantidos com água e comida à vontade até o início dos testes. O ciclo de luz (12/12 h, luzes ligadas às 6:00 h) e a temperatura ambiente (23,1°C) foram controlados. Todos os experimentos foram realizados conforme preconizados pela Lei nº 11794 de 08 de outubro de 2008 e pela Resolução normativa nº 52 de 19 de maio de 2021, do CONCEA, sendo os protocolos experimentais aprovados pelo CEUA da UFMS, sob o nº 525/2021.

### **4.3 Organização e análise dos dados**

#### **4.3.1 Drogas**

Antagonista de receptores de dopamina: haloperidol 1mg (Haldol-Janssen-Cilag); antagonista de receptores de acetilcolina M4: PCS1055 dihydrochloride. Inibidor da sintase do óxido nítrico: NG-nitro-L-arginine (L-NOARG - Sigma) Todas as drogas foram dissolvidas em solução salina a 0,9%.

#### **4.3.2 Experimentos e grupos experimentais**

Foram realizados 2 experimentos, com 6 grupos em cada um deles, como descritos a seguir, sendo cada grupo constituído de 8 camundongos. Cada animal foi utilizado somente em um dos grupos experimentais.

#### **4.3.2.1 Experimento I: Efeito da PCS1055 dihydrochloride nas alterações do comportamento motor induzidas pelo haloperidol**

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (I.P.) de salina ou haloperidol (2 mg/kg), seguida pela aplicação I.P. salina ou de PCS1055 dihydrochloride (2,5 e 10mg/kg), após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de salina e após 30 minutos, outra injeção I.P. de salina;

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de salina e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (2,5 mg/kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de salina e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride(10mg/kg);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de haloperidol (2mg/kg) e após 30 minutos, injeção I.P. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de haloperidol (2mg/kg) e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (2,5 mg/kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de haloperidol (2mg/kg) e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (10mg/kg).

#### **4.3.2.2 Experimento II: Efeito da PCS1055 dihydrochloride nas alterações do comportamento motor induzidas pelo L-NOARG**

Neste experimento os animais receberam injeção intraperitoneal (I.P.) de salina ou L-NOARG (40mg/kg), seguida pela aplicação I.P. salina ou de PCS1055 dihydrochloride (2,5 e 10mg/kg) após 30 minutos. Foram realizados os seguintes grupos experimentais:

Grupo 1 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de salina e após 30 minutos, outra injeção I.P. de salina;

Grupo 2 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de salina e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (2,5 mg/kg);

Grupo 3 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de salina e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (10mg/kg);

Grupo 4 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção I.P. de salina;

Grupo 5 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (2,5 mg/kg);

Grupo 6 (n=8): os animais receberam injeção I.P. de L-NOARG (40mg/kg) e após 30 minutos, injeção I.P. de PCS1055 dihydrochloride (10mg/kg).

### **4.3.3 Avaliação funcional dos animais**

A avaliação funcional dos animais após a aplicação das drogas foi realizada por meio do teste de catalepsia (Zarrindast; Modabber; Sabetkasai, 1993), e do teste do campo aberto (Walsh, 1976; Whimbey, 1967). Os testes de comportamento foram realizados sempre no mesmo horário e local, como descritos a seguir:

#### **4.3.3.1 Teste de catalepsia na barra**

A catalepsia foi avaliada de acordo com método da barra, onde o camundongo é colocado com ambas as patas anteriores sobre uma barra de vidro horizontal (diâmetro de 0,5 cm), elevada 4,5 cm do solo (Sanberg et al., 1988). O tempo em segundos, durante o qual o animal permanece nesta posição foi registrado, até um tempo máximo de 300 segundos (Zarrindast, Modabber & Sabetkasai, 1993), permitindo três tentativas de colocação do animal em posição cataléptica. O tempo de catalepsia foi considerado finalizado quando as patas anteriores tocaram o solo ou quando o camundongo subiu na barra. As medidas foram realizadas depois de 30, 60 e 90 minutos após a administração das drogas.

#### **4.3.3.2 Teste do campo aberto**

Este teste foi utilizado para avaliar o estado motor e a emocionalidade do animal. Este teste foi inicialmente descrito e utilizado por Calvin S. Hall na década de 1930, sendo o seu uso estendido e modificado por P. L. Broaderhurst na década de 1960, em estudos sobre o medo e a herança do comportamento, onde ficou demonstrado que a quantidade de bolos fecais expelidos pelo rato era relacionada positivamente com o medo. Através dos estudos de Whimbey e Denenberg (1967), ficou demonstrado que no teste de campo aberto, havia uma forte correlação positiva entre o comportamento de ambulação e o comportamento exploratório do rato (exceto no primeiro dia de teste no campo aberto), e negativamente

relacionados com o medo e a quantidade de bolos fecais expelidos durante o teste (Gray, 1987). Outros parâmetros de avaliação foram sendo gradativamente acrescentados ao teste, sendo que atualmente, mais de 30 itens são listados neste teste (Walsh, 1976).

Em nosso laboratório, os parâmetros avaliados durante a realização do teste do campo aberto foram: a frequência dos comportamentos de exploração horizontal e vertical, em uma arena cilíndrica, de 40 cm de diâmetro, com paredes de acrílico translúcido, de 30 cm de altura, colocada sobre uma base de madeira recoberta de fórmica de cor branca, a qual era subdividida em 12 quadrantes de 104,7 cm<sup>2</sup> cada.

#### **4.3.4 Análise estatística**

A avaliação do efeito do grupo experimental, do momento de análise e da interação entre esses fatores, em relação ao tempo de catalepsia apresentado pelos animais, tanto no experimento I, quanto no experimento II, foi realizada por meio do teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas, seguido pelo pós-teste de Tukey. Já a comparação entre os grupos experimentais, em relação à quantidade de comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e exploração vertical (erguimentos) apresentados pelos animais, tanto no experimento I, quanto no experimento II, foi realizada por meio do teste ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Tukey. Os demais resultados deste estudo foram apresentados na forma de estatística descritiva na forma de tabelas e gráficos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico SigmaPlot, versão 12.5, considerando um nível de significância de 5%.

#### **4.4 Aspectos éticos**

A coleta de dados teve início após cadastro no sistema SigProj e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

Reiterou-se que a pesquisa não traria riscos imediatos ou futuros aos animais, e os benefícios seriam indiretos, considerando que a utilização dos dados ocorreria em momento subsequente à finalização da pesquisa, para a análise do comportamento por meio de tabelas, por se tratar de dados estatísticos analíticos.



Os dados coletados ficaram sob a guarda e responsabilidade do pesquisador, e os resultados decorrentes do estudo, foram apresentados em forma de relatório final e em eventos científicos pertinentes, estando prevista, ainda, a elaboração de artigos científicos a serem submetidos para a apreciação de periódicos científicos com Qualis A-B.

## 5. RESULTADOS

Os resultados da avaliação do efeito do grupo experimental, do momento de análise e da interação entre esses fatores, em relação ao tempo de catalepsia apresentado pelos animais, tanto no experimento I, quanto no experimento II, estão apresentados na Tabela 1 e ilustrados nas Figuras 1 e 2.

No Experimento I houve efeito do grupo experimental, do momento de análise e interação entre esses dois fatores, em relação ao tempo de catalepsia apresentado pelos animais (teste ANOVA de duas vias, Efeito do grupo:  $p < 0,001$ ; Efeito do momento:  $p < 0,001$ ; Interação entre grupo e momento:  $p < 0,001$ ). Nos momentos de 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, o tempo de catalepsia nos animais que receberam haloperidol (Haloperidol+Salina, Haloperidol+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Haloperidol+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg) foi significativamente maior do que aquele observado entre os animais dos grupos Salina+Salina, Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Além disso, no momento de 90 minutos, o tempo de catalepsia dos animais que receberam haloperidol e PCS1055, em ambas as doses avaliadas (2,5 e 10,0 mg/kg) foi maior do que entre os animais que receberam haloperidol mais salina (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ), indicando uma potencialização do efeito cataléptico do haloperidol, com o uso do PCS1055.

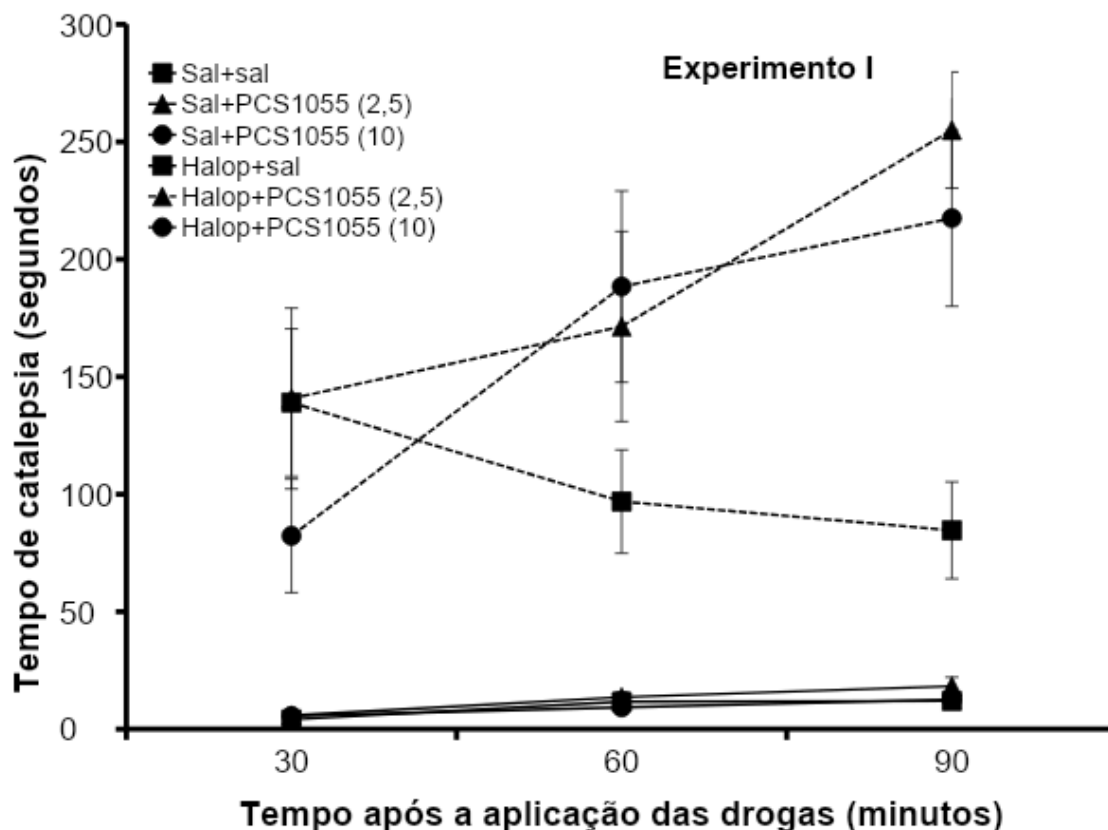
Na comparação entre os momentos 30, 60 e 90 minutos, em relação ao tempo de catalepsia dos animais, em todos os grupos experimentais foi observado diferença significativa entre os momentos (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ), sendo que com exceção do grupo Haloperidol+Salina, todos os demais grupos apresentaram um perfil de aumento da catalepsia no decorrer do tempo, enquanto que no grupo Haloperidol+Salina houve uma diminuição do tempo de catalepsia no decorrer do tempo. Esses resultados podem ser melhores visualizados na Figura 1.

Tabela 1: Resultados da avaliação do efeito do grupo experimental, do momento de análise e da interação entre esses fatores, em relação ao tempo de catalepsia apresentado pelos animais, tanto no experimento I, quanto no experimento II.

Grupo experimental	Tempo de catalepsia (s)		
	30 min.	60 min.	90 min.
<b>Experimento I</b>			
Salina+Salina	4,13±0,61Bb	11,63±2,16Ba	12,00±3,31Ca
Salina+PCS1055 (2,5 mg/kg)	5,88±0,72Bb	13,63±2,31Ba	18,25±3,85Ca
Salina+PCS1055 (10,0 mg/kg)	5,63±1,00Bb	9,25±1,44Bab	12,63±2,42Ca
Haloperidol+Salina	139,00±31,41Aa	96,88±22,01Aab	84,63±20,62Bb
Haloperidol+PCS1055 (2,5 mg/kg)	140,75±38,48Ab	171,38±40,45Ab	255,00±24,71Aa
Haloperidol+PCS1055 (10,0 mg/kg)	82,25±24,17Ab	188,38±40,71Aa	217,50±37,50Aa
Valores de p	Efeito do grupo: p<0,001 Efeito do momento: p<0,001 Interação entre grupo e momento: p<0,001		
<b>Experimento II</b>			
Salina+Salina	4,50±0,53Bc	9,75±2,40Bb	15,75±5,09Ba
Salina+PCS1055 (2,5 mg/kg)	14,88±5,07Bc	28,63±13,35Bb	39,00±20,50Ba
Salina+PCS1055 (10,0 mg/kg)	6,63±0,50Bc	11,13±2,45Bb	19,13±2,63Ba
L-Noarg+Salina	173,25±37,58Ac	226,75±33,83Ab	285,00±15,00Aa
L-Noarg+PCS1055 (2,5 mg/kg)	64,75±36,07Ac	157,50±35,74Ab	195,50±42,91Aa
L-Noarg+PCS1055 (10,0 mg/kg)	171,25±50,14Ac	242,63±35,23Ab	270,00±22,68Aa
Valores de p	Efeito do grupo: p<0,001 Efeito do momento: p<0,001 Interação entre grupo e momento: p=0,285		

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Valores de p no teste ANOVA de duas vias de medidas repetitivas. Letras maiúsculas diferentes na coluna, indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey, p<0,05). Letras minúsculas diferentes na linha, indicam diferença significativa entre os momentos de avaliação da catalepsia (pós-teste de Tukey, p<0,05).

Figura 1: Gráfico apresentando o tempo de catalepsia, entre os animais de cada grupo experimental do Experimento I, 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.

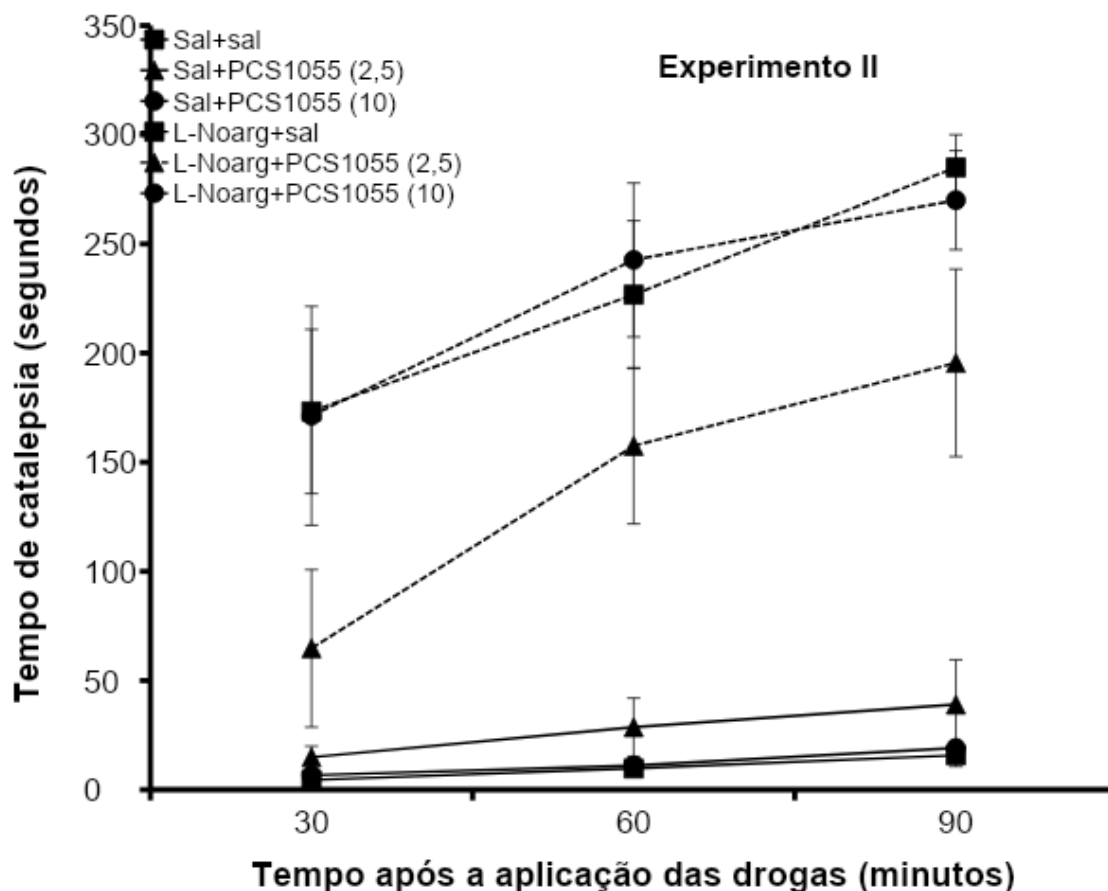


No Experimento II também houve efeito do grupo experimental e do momento de análise, em relação ao tempo de catalepsia apresentado pelos animais (teste ANOVA de duas vias, Efeito do grupo:  $p < 0,001$ ; Efeito do momento:  $p < 0,001$ ), porém, sem interação significativa entre esses dois fatores (Interação entre grupo e momento:  $p = 0,285$ ). Nos momentos de 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas, o tempo de catalepsia nos animais que receberam L-Noarg (L-Noarg+Salina, L-Noarg+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e L-Noarg+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg) foi significativamente maior do que aquele observado entre os animais dos grupos Salina+Salina, Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Na comparação entre os momentos 30, 60 e 90 minutos, em relação ao tempo de catalepsia dos animais, como houve efeito significativo do momento, mas sem interação entre momento e grupo, a análise do pós-teste foi feita em

bloco e evidenciou que, no Experimento II, todos os grupos apresentaram um perfil de aumento da catalepsia no decorrer do tempo. Esses resultados podem ser melhores visualizados na Figura 2.

Figura 2: Gráfico apresentando o tempo de catalepsia, entre os animais de cada grupo experimental do Experimento II, 30, 60 e 90 minutos após a aplicação das drogas. Cada símbolo representa a média e a barra o erro padrão da média.



Na tabela 2 estão apresentados os resultados da comparação entre os grupos experimentais, em relação à quantidade de comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e exploração vertical (erguimentos) apresentados pelos animais, tanto no experimento I, quanto no experimento II.

Em ambos os experimentos (I e II), houve diferença entre os grupos experimentais, em relação ao número de quadrantes percorridos e ao número de erguimentos expressos pelos animais (teste ANOVA de uma via,  $p < 0,001$  para todas as comparações).

Tabela 2: Resultados da comparação entre os grupos experimentais, em relação à quantidade de comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e exploração vertical (erguimentos) apresentados pelos animais, tanto no experimento I, quanto no experimento II.

Grupo experimental	Exploração no Campo Aberto	
	Quadrantes percorridos	Erguimentos
<b>Experimento I</b>		
Salina+salina	90,50±8,50A	31,25±3,77AB
Salina+PCS1055 (2,5 mg/kg)	85,63±10,43A	20,13±6,17B
Salina+PCS1055 (10,0 mg/kg)	92,38±9,27A	33,25±2,62A
Haloperidol+salina	46,75±5,96B	4,88±1,56C
Haloperidol+PCS1055 (2,5 mg/kg)	5,25±2,61C	0,25±0,25C
Haloperidol+PCS1055 (10,0 mg/kg)	7,13±5,87C	1,00±1,00C
Valor de p	<0,001	<0,001
<b>Experimento II</b>		
Salina+salina	112,25±6,35A	39,38±3,72A
Salina+PCS1055 (2,5 mg/kg)	70,00±13,19BC	24,25±4,50B
Salina+PCS1055 (10,0 mg/kg)	82,13±10,07AB	26,13±5,21AB
L-Noarg+salina	19,13±10,05D	0,25±0,25C
L-Noarg+PCS1055 (2,5 mg/kg)	41,88±8,34CD	4,63±3,54C
L-Noarg+PCS1055 (10,0 mg/kg)	7,63±5,03D	0,50±0,33C
Valor de p	<0,001	<0,001

Os resultados estão apresentados em média±erro padrão da média. Valor de p no teste ANOVA de uma via. Letras maiúsculas diferentes na coluna, indicam diferença significativa entre os grupos experimentais (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

No Experimento I, a quantidade de quadrantes percorridos pelos animais que receberam haloperidol (Haloperidol+Salina, Haloperidol+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Haloperidol+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg) foi significativamente menor do que aquela observada entre os animais dos grupos Salina+Salina, Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e

Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Além disso, a quantidade de quadrantes percorridos pelos animais dos grupos Haloperidol+ PCS1055 dose de 2,5 mg/kg e Haloperidol+ PCS1055 dose de 10,0 mg/kg, foi significativamente menor do que aquela observada entre os animais do grupo Haloperidol+Salina, indicando uma potencialização do efeito do haloperidol na locomoção dos animais, com o uso do PCS1055.

Em relação aos erguimentos, a expressão desse comportamento também foi menor nos animais dos grupos que receberam haloperidol (Haloperidol+Salina, Haloperidol+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Haloperidol+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg), quando comparados com aqueles que receberam salina como primeira droga (Salina+Salina, Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg) (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Além disso, os animais dos grupos Salina+Salina e Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg, apresentaram uma menor quantidade de erguimentos, quando comparados com aqueles do grupo Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Esses resultados estão ilustrados na Figura 3.

No Experimento II, a quantidade de quadrantes percorridos pelos animais que receberam L-Noarg (L-Noarg+Salina, L-Noarg+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e L-Noarg+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg) foi também significativamente menor do que aquela observada entre os animais dos grupos Salina+Salina, Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Além disso, a quantidade de quadrantes percorridos pelos animais do grupo Salina+PCS1055, na dose de 2,5 mg/kg, foi menor do que entre aqueles do grupo Salina+Salina, (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

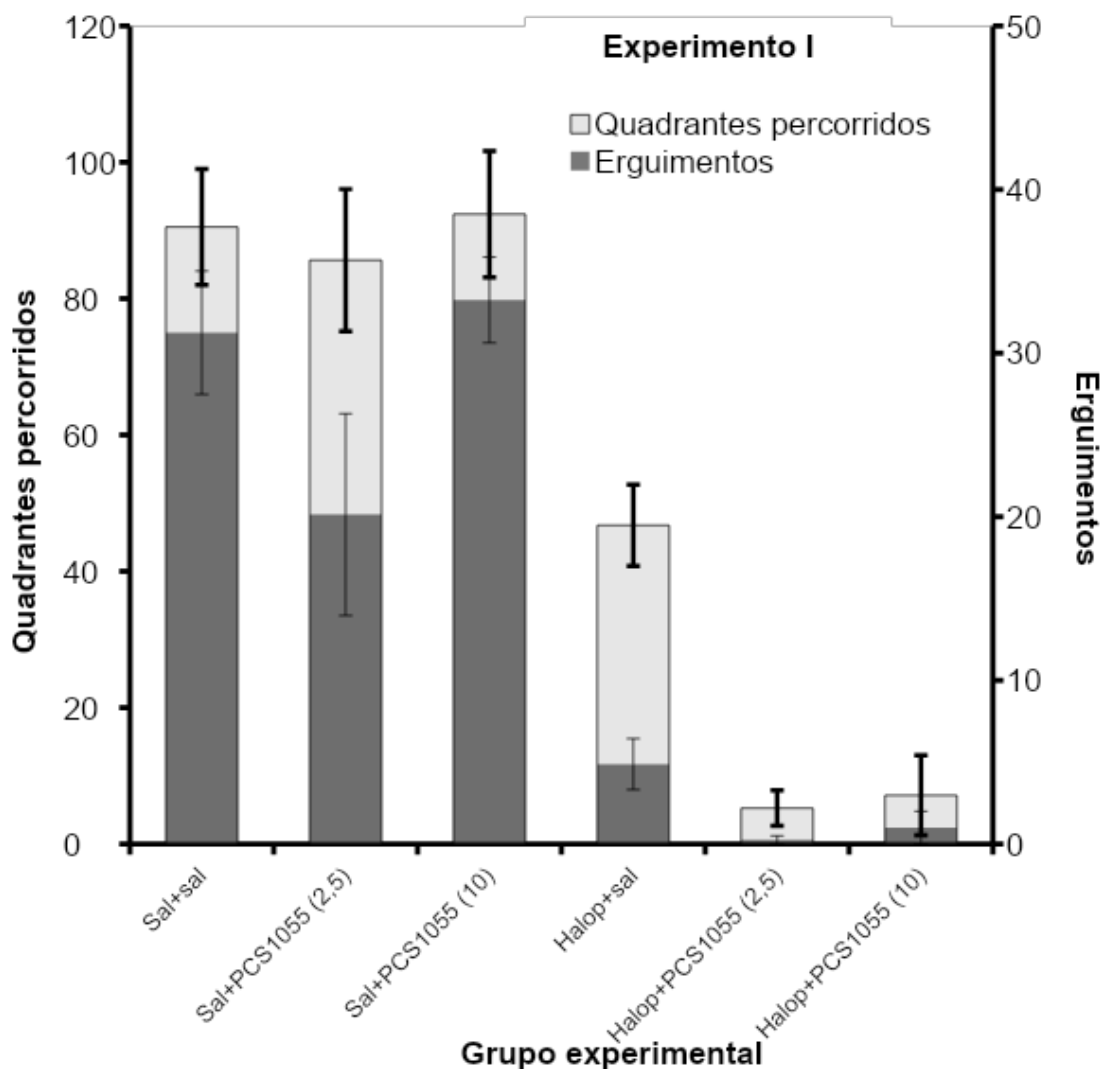


Figura 3: Gráfico de duplo eixo Y apresentando a quantidade de comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e exploração vertical (erguimentos) apresentados pelos animais de cada grupo experimental do Experimento I. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média.

Em relação aos erguimentos, no Experimento II, a expressão desse comportamento também foi menor nos animais dos grupos que receberam L-Noarg (L-Noarg+Salina, L-Noarg+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e L-Noarg+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg), quando comparados com aqueles que receberam salina como primeira droga (Salina+Salina, Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg e Salina+PCS1055 na dose de 10,0 mg/kg) (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Além disso, os animais dos grupos Salina+PCS1055 na dose de 2,5 mg/kg, apresentaram uma menor quantidade de erguimentos, quando



comparados com aqueles do grupo Salina+Salina (pós-teste de Tukey,  $p < 0,05$ ). Esses resultados estão ilustrados na Figura 4.

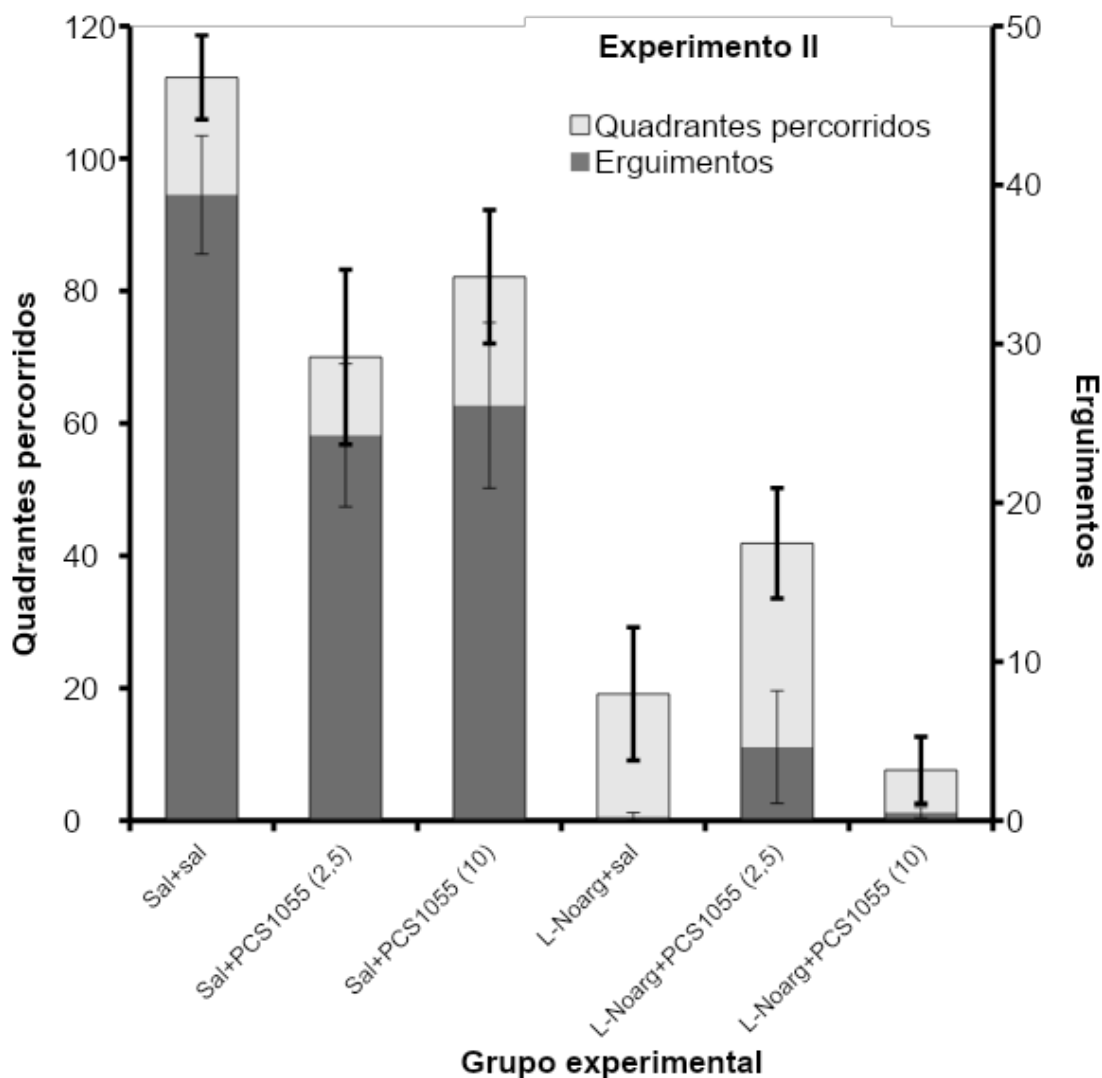


Figura 4: Gráfico de duplo eixo Y apresentando a quantidade de comportamentos de exploração horizontal (quadrantes percorridos) e exploração vertical (erguimentos) apresentados pelos animais de cada grupo experimental do Experimento II. Cada coluna representa a média e a barra o erro padrão da média.

## 6. DISCUSSÃO

A DP é uma condição que se manifesta, principalmente, por distúrbios de movimento, causados pela morte significativa dos neurônios dopaminérgicos na substância negra compacta. O tratamento atual baseia-se na terapia de reposição dopaminérgica, com o objetivo de reverter os efeitos da depleção dopaminérgica estriatal, resultante da degeneração da via nigro-estriatal (Cerri, 2020; Bougea *et al.*, 2019; Pontone *et al.*, 2022). Entretanto, novos avanços para o tratamento das desordens dos movimentos baseadas na manipulação de sistemas não dopaminérgicos tais como glutamato, 5-hidroxitriptamine (5-HT), canabinóides, adenosina, adrenérgicos, histaminérgicos, opióides e receptores colinérgicos nicotínicos e muscarínicos têm sido propostos (Chase *et al.*, 2000; Silverdale *et al.*, 2003; Brotchie, 2005; Jenner, 2008).

Em estudos com animais, modelos farmacológicos para a DP são amplamente utilizados para gerar catalepsia e alterações motoras. O haloperidol, um antagonista do receptor dopaminérgico do tipo D2, é comumente empregado nesses modelos, e os sintomas observados nos animais mimetizam aqueles encontrados em pacientes com a doença (Clark *et al.*, 2009; Ossowska *et al.*, 1996; Trevitt *et al.*, 2009; Wadenberg *et al.*, 2001).

Neste estudo, a antagonização dos receptores de dopamina, com haloperidol, causou catalepsia nos animais, como esperado. Também foi observada a diminuição da exploração horizontal e vertical, no teste de campo aberto nos animais analisados. Estes achados hipocinéticos são coerentes com experimentos anteriores, os quais constataram que a inibição de receptores de dopamina dos núcleos basais do encéfalo produz catalepsia e hipocinesia, sintomas semelhantes àqueles observados em pacientes com DP (Del Bel *et al.*, 2002; Hauber *et al.*, 2001).

A acetilcolina e dopamina interagem fortemente no estriado e desempenham um papel importante no controle motor normal. O desequilíbrio da transmissão de acetilcolina e dopamina no sistema nigro-estriatal é a base patogênica das desordens extrapiramidais, como no caso da DP. A diminuição da atividade do sistema dopaminérgico é paralela ao aumento da atividade do sistema colinérgico (Threlfell *et al.*, 2010).

Evidências experimentais sugerem as propriedades anti-parkinsonianas de alguns antagonistas muscarínicos de acetilcolina, como a escopolamina, antagonista muscarínico de acetilcolina com maior afinidade com o receptor tipo M1, ao reduzir catalepsia induzida por haloperidol em camundongos (Haraguchi *et al.*, 1997). A administração de biperideno, anticolinérgico central, também com afinidade para o receptor tipo M1, foi investigada após indução de catalepsia por amoxapina, cinarizina e ciclosfamida em camundongos, onde a catalepsia foi significativamente revertida (Nasu *et al.*, 2000).

Estes eventos reforçam o fato de antagonistas não seletivos de receptores muscarínicos de acetilcolina já serem utilizados como drogas anti-parkinsonianas. No entanto, estudos têm demonstrado a abundância de receptores M4 encontrados no estriado. Por desempenharem um importante papel na função motora, supõe-se que antagonistas de receptores muscarínicos M4 poderiam também ser úteis na restauração do equilíbrio entre dopamina e acetilcolina (Guo *et al.*, 2010).

Foi revelado em um estudo de imunoprecipitação que 45% dos receptores muscarínicos do estriado são do subtipo M4 (Karasawa; Taketo; Matsui, 2003). Imunohistoquimicamente foi detectado 92% de receptores muscarínicos M4 nos neurônios estriatonigrais, demonstrando que os neurônios estriatonigrais co-expressam receptores muscarínicos M4 e receptores de dopamina D1 (Ince, Cilax; Levey, 1997).

Estes dois receptores desempenham papéis opostos no metabolismo de cAMP. A estimulação dos receptores de dopamina D1 ativam a adenilatociclase, via proteína G, e a estimulação dos receptores muscarínicos M4 inibem a atividade enzimática, via proteína G, sugerindo o equilíbrio de acetilcolina-dopamina que reflete os efeitos neutralizantes desses neurotransmissores à nível de cAMP (Thomsen, Sørensen, Dencker, 2018).

Em humanos, o receptor muscarínico do tipo M4, pertencente à subfamília classe A dos receptores acoplados à proteína G, tem se destacado como um alvo promissor para o tratamento de doenças como Alzheimer e esquizofrenia. Estudos, como o de Wang *et al.* (2020), indicam que a transmissão colinérgica mediada pelo M4 também está associada aos sintomas motores na DP. O estriado, onde os sistemas dopaminérgicos e colinérgicos interagem, é uma estrutura fundamental dos NB envolvida nas alterações

fisiopatológicas subjacentes à DP. Resultados recentes mostram que a transmissão colinérgica alterada via M1 e M4 no estriado dorsal desempenha um papel crucial na manifestação dos sintomas motores da DP (Felder, 2018).

Este estudo utilizou os testes de catalepsia na barra e do Campo Aberto para avaliar a eficácia da droga PCS1055 dihydrochloride, um antagonista muscarínico seletivo para os receptores do tipo M4, na reversão da catalepsia e das alterações motoras causadas por dois modelos farmacológicos da DP, nos núcleos basais de camundongos.

A droga PCS1055 dihydrochloride, um antagonista de receptores muscarínicos, atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e é um potente e seletivo antagonista competitivo do receptor muscarínico M4. Ela exibe uma seletividade 100 vezes maior pelos receptores M4 em comparação com os receptores M1, M3 e M5, e uma seletividade 30 vezes maior em relação ao receptor M2. Estudos indicam que a PCS1055 dihydrochloride tem uma forte afinidade pelos receptores M4, tornando-a um candidato promissor para pesquisas sobre doenças neuropsiquiátricas, como Alzheimer e esquizofrenia. Além disso, a alta seletividade da PCS1055 contribui para minimizar potenciais efeitos colaterais associados à ativação de outros subtipos de receptores muscarínicos (Croy *et al.*, 2016).

No entanto, em nosso estudo o antagonista de receptores M4 de acetilcolina PCS1055 não só não reverteu a catalepsia induzida por haloperidol, como potencializou o seu efeito, aumentando o tempo de catalepsia dos animais, em ambas as doses utilizadas da droga (Haloperidol+PCS1055 2,5 mg/kg e Haloperidol+PCS1055 10,0 mg/kg), no momento de 90 minutos após a aplicação das drogas. O PCS1055 também potencializou os efeitos do haloperidol no comportamento de exploração horizontal (quadrantes percorridos), em ambas as doses utilizadas da droga.

Tais resultados divergem daqueles esperados, visto que, em outro estudo o antagonista seletivo para receptores M1/M4, pirenzepina, causou uma reversão da catalepsia de forma dose dependente (Erosa-Rivero *et al.*, 2014).

Outro neurotransmissor que pode estar envolvido na prevenção de discinesias induzidas pela administração repetida de L-DOPA é o óxido nítrico.

Assim como o bloqueio de receptores dopaminérgicos, modelos que utilizam a inibição da enzima óxido nítrico sintase (NOS) têm demonstrado

resultados significativos na geração de catalepsia e outras alterações motoras em experimentos com animais. A interferência na formação de óxido nítrico (NO) pode causar déficits em diversos testes motores. Inibidores da NOS reduzem a locomoção e a exploração vertical de camundongos no teste do Campo Aberto (Del Bel *et al.*, 2002; Corrêa; Souza, 2019) e a atividade motora espontânea de ratos (Halcaçak *et al.*, 2000). Além disso, os inibidores da NOS, como L-NOARG e 7-NI, suprimem a atividade locomotora induzida por agonistas dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 (Starr; Starr, 1995). Esses autores sugerem que a atividade contínua ou tônica da NOS constitutiva é necessária para a manutenção de movimentos corporais normais.

Estes eventos permitem correlacionar interferências na formação do NO com a produção de déficits motores encontrados no comportamento motor de animais com Parkinson. Corroboram com esses dados, estudos anteriores que constataram que os inibidores da NOS diminuem a locomoção e exploração vertical de camundongos no teste do campo aberto (Del Bel *et al.*, 2002) e a atividade motora espontânea de ratos (Halcaçak *et al.*, 2000).

O NO é uma molécula lipossolúvel de curta vida, gerada a partir do aminoácido L-Arginina, que pertence a família de enzimas chamadas de sintase do óxido nítrico (NOS). Embora a produção de interneurônios componha apenas 1% - 2% da população de neurônios estriatais, evidências convincentes têm demonstrado que o NO controla o comportamento motor modulando a integração e informação processada pelos núcleos da base. Mecanismos nitrérgicos podem contribuir com a morte de neurônios de DA visto na DP (Gomes *et al.*, 2008). A modulação do NO libera vários neurotransmissores incluindo DA, 5- hidroxitriptamina (5-HT), acetilcolina e GABA (Nowaczyk *et al.*, 2021). Inibidores da sintase do óxido nítrico (NOS) diminuem os níveis de acetilcolina estriatal (Hanania, Johnson, 1998). Porém, à nível de comportamento a interação entre NO e acetilcolina não está bem esclarecida.

Tem sido proposto que o NO desempenha um papel pivô no controle homeostático no processo que fornece estabilidade ao sistema DA-nigral. O bombardeio de neurônios dopaminérgicos causa a liberação de NO a partir de interneurônios GABAérgicos estriatais (Sammur *et al.*, 2006) o qual por sua vez influencia a indução a longo prazo da depressão do estriado (Calabresi *et al.*,

2006). A terapia com L-DOPA tem demonstrado causar um aumento marcante na produção de NO (Itokawa *et al.*, 2006).

Padovan-Neto *et al.* (2009) hipotetizaram que a redução endógena tônica de nitrérgicos induzida pelo tratamento com inibidores da NOS poderiam diminuir os movimentos involuntários anormais induzidos pela L-DOPA, em ratos com lesões neurotóxicas da via dopaminérgica nigroestriatal. Observou-se que o inibidor seletivo da sintase do NO (Nnos)7-NI, aumentou a performance motora de ratos com discinesia. Diante destes resultados, apontando que os inibidores da sintase de NOS são capazes de reduzir as discinesias induzidas pela terapia com L-DOPA, estes pesquisadores sugerem que a hiperatividade do sistema nitrérgico está envolvida nesta desordem.

West e Grace (2000) sugeriram que o NO ocupa um papel modulatório no estriado, mudando sua relação “input-output” (entrada-saída) e produzindo um impacto funcional significativo nos neurônios alvos. Também pela influência ao longo prazo da depressão no estriado pela via NO/cGMP tem sido proposta no controle da conectividade corticoestriatal (Calabresi *et al.*, 2006). O lançamento de NO a partir de interneurônios estriatais facilitam concomitantemente o lançamento de DA (Nowaczyk *et al.*, 2021) e a produção de NO pelos interneurônios estriatais que são regulados pela transmissão fásica de DA (West; Grace, 2000).

Nesta pesquisa, da mesma forma que o haloperidol, no experimento II, a aplicação de L-NOARG, um antagonista da sintase do óxido nítrico, causou catalepsia e hipolocomoção nos animais, nos 3 momentos analisados. Esses resultados corroboram com achados de estudos anteriores, que demonstraram que os inibidores da NOS reduzem significativamente a locomoção e a exploração vertical de camundongos no teste do campo aberto (Corrêa; Souza, 2019; Del Bel *et al.*, 2002), além de diminuírem a atividade motora espontânea de ratos (Halcaçak *et al.*, 2000).

Além disso, o antagonista de receptores M4 de acetilcolina PCS1055 também não foi capaz de reverter a catalepsia induzida pelo L-NOARG, assim, como aconteceu para o haloperidol. No entanto, em nenhum dos momentos analisados, não foi observada uma potencialização dos efeitos do L-NOARG, pelo PCS1055, como observado no experimento I, com o haloperidol. Ainda no experimento II, o PCS1055 diminuiu, por si só, o comportamento de exploração

horizontal e vertical nos animais, além de não reverter os efeitos do L-NOARG nesses comportamentos.

Considerando todos os resultados da nossa pesquisa, em conjunto, eles mostraram que o PCS1055 teve um efeito totalmente contrário àquele esperado, em relação à reversão da catalepsia e às alterações do comportamento exploratório dos animais no campo aberto, induzidas tanto pelo haloperidol, como pelo L-NOARG.

Estes resultados podem favorecer o entendimento da fisiologia dos Núcleos da Base e a fisiologia da DP, além de contribuir com a busca de novas manipulações farmacológicas para o tratamento da DP capazes de apresentar um potencial terapêutico em todas as fases da doença, sem o declínio da eficiência e que possam também prevenir o surgimento de complicações. Em vista disso, é necessário que haja mais estudos que testem diretamente a hipótese de que o antagonismo de M4 realmente possui eficácia em distúrbios do movimento, uma vez que há poucos registros de que os inibidores considerados seletivos de receptores M4 são verdadeiramente seletivos a esse subtipo de receptor (Moehle *et al.*, 2021).

Como em qualquer pesquisa científica, nosso estudo apresentou algumas limitações que devem ser reconhecidas para contextualizar de forma adequada os resultados obtidos e suas implicações. Uma dessas limitações foi o fato de a PCS1055 ser uma droga relativamente nova no mercado. Como resultado, há uma quantidade limitada na literatura de estudos anteriores disponíveis para fomentar uma comparação com nossos achados e fundamentar nossas hipóteses. A falta de estudos longitudinais sobre a PCS1055 dificulta a validação e a comparação dos nossos resultados com pesquisas preexistentes, principalmente em relação à definição da dose ideal para se obter os resultados esperados, bem como evitar possíveis efeitos colaterais dessa substância. Estudos futuros devem considerar o uso de uma faixa de dosagens mais ampla para melhor compreender a resposta dose-dependente dessa droga.

Portanto, é necessário cautela ao interpretar os resultados e observar direções importantes para pesquisas futuras. Estudos adicionais com amostras maiores, maior duração e diferentes dosagens da PCS1055 são essenciais

para validar e expandir nossos achados, proporcionando uma compreensão mais completa sobre a eficácia e segurança desta droga.



## 7. CONCLUSÕES

O antagonista de dopamina, haloperidol, causou catalepsia e diminuição na exploração horizontal e exploração vertical. No entanto, de forma inesperada, o antagonista de receptores M4 de acetilcolina PCS1055 não foi capaz de reverter a catalepsia induzida por haloperidol, e além disso potencializou o seu efeito, em ambas as doses utilizadas da droga, no momento de 90 minutos após a aplicação das drogas. O PCS1055 também potencializou os efeitos do haloperidol no comportamento de exploração horizontal, em ambas as doses utilizadas da droga.

O antagonista da sintase de óxido nítrico, L-NOARG, assim como o haloperidol, causou alterações motoras nos animais, sendo que o PCS1055 também não foi capaz de reverter a catalepsia induzida nem as alterações locomotoras causadas pelo L-NOARG, assim, como aconteceu para o haloperidol. No entanto, em nenhum dos momentos analisados, não foi observada uma potencialização dos efeitos do L-NOARG, pelo PCS1055. O PCS1055 diminuiu, por si só, o comportamento de exploração horizontal e vertical nos animais, além de não reverter os efeitos do L-NOARG nesses comportamentos.

Estudos futuros devem explorar outros antagonistas muscarínicos, bem como diferentes modelos experimentais, sejam eles animais ou in vitro, para investigar com maior precisão o papel do receptor muscarínico M4 na modulação motora. Além disso, é fundamental realizar testes com diferentes dosagens da PCS1055 para aprofundar a compreensão sobre a função dos receptores M4 na fisiologia dos núcleos da base do encéfalo, estrutura intimamente relacionada à fisiopatologia da Doença de Parkinson.

## REFERÊNCIAS

- ANJOS, A. F. DOS et al. Óxido nítrico e o aumento do desempenho nas atividades físicas com a suplementação de origem vegetal. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 12, p. e289101220652, 2021.
- BEL, E. D. et al. Motor effects of acute and chronic inhibition of nitric oxide synthesis in mice. **Psychopharmacology**, v. 161, n. 1, p. 32–37, 2002.
- BETZ, J. A. et al. The muscarinic receptor antagonist tropicamide suppresses tremulous jaw movements in a rodent model of parkinsonian tremor: possible role of M4 receptors. **Psychopharmacology**, v. 194, p. 347-359, June 2007.
- BLOM, J. J.; BLUTE, T. A.; ELDRED, W. D. Functional localization of the nitric oxide/cGMP pathway in the salamander retina. **Visual neuroscience**, v. 26, n. 3, p. 275–286, 2009.
- BOUGEA, A. et al. Levodopa-induced skin disorders in patients with Parkinson disease: a systematic literature review approach. **Acta neurologica belgica**, v. 119, n. 3, p. 325–336, 2019.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. NITRIC OXIDE: A physiologic messenger molecule. **Annual review of biochemistry**, v. 63, n. 1, p. 175–195, 1994.
- BROTCHIE JM. Adjuncts to dopamine replacement: a pragmatic approach to reducing the problem of dyskinesia in Parkinson's disease. **Mov Disord**. 1998;13(6):871-876.
- BROTCHIE JM. Nondopaminergic mechanisms in levodopa-induced dyskinesia. **Mov Disord**. 2005;20(8):919-931.
- BUJAS-BOBANOVIC, M. et al. Blockade of phencyclidine-induced effects by a nitric oxide donor. **British journal of pharmacology**, v. 130, n. 5, p. 1005–1012, 2000.
- CALABRESI, P. et al. A convergent model for cognitive dysfunctions in Parkinson's disease: the critical dopamine–acetylcholine synaptic balance. **Lancet neurology**, v. 5, n. 11, p. 974–983, 2006.
- CAVAS, M.; NAVARRO, J. F. Coadministration of L-NOARG and tiapride: Effects on catalepsy in male mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, n. 1, p. 69–73, 2002.
- CERRI, S.; BLANDINI, F. An update on the use of non-ergot dopamine agonists for the treatment of Parkinson's disease. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 21, n. 18, p. 2279–2291, 2020.
- CHALIMONIUK, M.; STEPIEŃ, A. Influence of the therapy with pergolide mesylate plus L-DOPA and with L-DOPA alone on serum cGMP level in PD patients. **Polish journal of pharmacology**, v. 56, n. 5, 2004.

CORRÊA, É. M. S.; SOUZA, A. S. Effect of Antagonization of M4 Receptors With Tropicamide, Catalepsy and Motor Changes Induced by Nitroergic Inhibition, in Mice. **International Journal of Development Research**, n. 09, p. 26589–26595, 2019.

CROY, C. H. et al. Characterization of PCS1055, a novel muscarinic M4 receptor antagonist. **European journal of pharmacology**, v. 782, p. 70–76, 2016.

DAGAEV, G. S. et al. Effects of cholinoblockers on acetylcholine content in rat striatum in neuroleptic-induced parkinsonism. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 137, n. 2, p. 187-189, Feb. 2004.

DEL-BEL, E. A. et al. Tolerance to the cataleptic effect that follows repeated nitric oxide synthase inhibition may be related to functional enzymatic recovery. **Journal of psychopharmacology (Oxford, England)**, v. 24, n. 3, p. 397–405, 2010.

EROSA-RIVERO, H. B. et al. The potency and efficacy of anticholinergics to inhibit haloperidol-induced catalepsy in rats correlates with their rank order of affinities for the muscarinic receptor subtypes. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 176–187, 2014.

FARADJI, H. et al. Sleep and epilepsy: A key role for nitric oxide? **Epilepsia**, v. 41, n. 7, p. 794-801, July 2000.

FELDER, C. C. et al. Current status of muscarinic M1 and M4 receptors as drug targets for neurodegenerative diseases. **Neuropharmacology**, v. 136, p. 449–458, 2018.

FERREIRA-JUNIOR, N. C. et al. Biological bases for a possible effect of cannabidiol in Parkinson's disease. **Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil: 1999)**, v. 42, n. 2, p. 218–224, 2020.

GOMES, M. Z.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. A. A nitric oxide synthase inhibitor decreases 6-hydroxydopamine effects on tyrosine hydroxylase and neuronal nitric oxide synthase in the rat nigrostriatal pathway. **Brain research**, v. 1203, p. 160–169, 2008.

GÓNGORA-ALFARO, L. J. et al. La cafeína y los antagonistas de los receptores A2A de la adenosina como posibles adyuvantes de la terapia anticolinérgica en la enfermedad de Parkinson. **Revista Biomédica**, v. 16, n. 2, p. 99–112, 2005.

GRANZOTTO, A. et al. Long-term dynamic changes of NMDA receptors following an excitotoxic challenge. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 5, p. 911, 2022.

GRAY, J. A. The inheritance of fear. The psychology of fear and stress. **Cambridge: Press Syndicate of the University of Cambridge**, 1987.

GUO, M.-L. et al. CaMKII $\alpha$  interacts with M4 muscarinic receptors to control receptor and psychomotor function. **The EMBO journal**, v. 29, n. 12, p. 2070–2081, 2010.

HALCÁK, L. et al. Inhibition of NO synthase activity in nervous tissue leads to decreased motor activity in the rat. **Physiological research**, v. 49, n. 1, p. 143-149, 2000.

HANANIA, T.; JOHNSON M. K. Regulation of neurotransmitter release by endogenous nitric oxide in striatal slices. **Eur.J.Pharmacol.** v. 359, p. 111-117, Aug. 1998.

HARAGUCHI, K. et al. Prediction of drug-induced catalepsy based on dopamine D1, D2, and muscarinic acetylcholine receptor occupancies. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 25, n. 6, 1997.

HAUBER, W. et al. Catalepsy induced by a blockade of dopamine D1 or D2 receptors was reversed by a concomitant blockade of adenosine A2A receptors in the caudate-putamen of rats. **The European journal of neuroscience**, v. 14, n. 8, p. 1287–1293, 2001.

HOQUE, K. E.; WEST, A. R. Dopaminergic modulation of nitric oxide synthase activity in subregions of the rat nucleus accumbens. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 66, n. 3, p. 220–231, 2012.

IACOPUCCI, A. P. et al. L-NOARG-induced catalepsy can be influenced by glutamatergic neurotransmission mediated by NMDA receptors in the inferior colliculus. **Behavioural brain research**, v. 234, n. 2, p. 149–154, 2012.

INCE, E.; CILIAUX, B. J.; LEVEY, A. I. Differential expression of D1 and D2 dopamine and m4 muscarinic acetylcholine receptor proteins in identified striatonigral neurons. **Synapse (New York, N.Y.)**, v. 27, n. 4, p. 357–366, 1997.

ITOKAWA, K. et al. Effect of L-DOPA on nitric oxide production in striatum of freely mobile mice. **Neuroscience letters**, v. 402, n. 1–2, p. 142–144, 2006.

JANKOVIC J. Levodopa strengths and weaknesses. **Neurology**. 2002;58(4 Suppl 1):S19-S32.

JENNER P. A2A antagonists as novel non-dopaminergic therapy for motor dysfunction in PD. **Neurology**. 2003;61(11 Suppl 6):S32-S38.

JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature reviews. Neuroscience*, v. 9, n. 9, p. 665–677, 2008.

JENNER P. Pathophysiology and biochemistry of dyskinesia: clues for the development of non-dopaminergic treatments. **J Neurol**. 2000;247 Suppl 2:II43-II50.

JONES, A. M. et al. Dietary nitrate and nitric oxide metabolism: Mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise performance: Mouth, circulation, skeletal muscle, and exercise performance. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 53, n. 2, p. 280–294, 2021.

JURI C.; CHANÁ P. Levodopa en la enfermedad de Parkinson. ¿Qué hemos aprendido? **Rev Méd Chile**. 2006; 134: 893-901.

KANDA, T.; JENNER, P. Can adenosine A2A receptor antagonists modify motor behavior and dyskinesia in experimental models of Parkinson's disease?. **Parkinsonism & related disorders**, v. 80 Suppl 1, p. S21–S27, 2020.

KAPIL, V. et al. The noncanonical pathway for in vivo nitric oxide generation: The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway. **Pharmacological reviews**, v. 72, n. 3, p. 692–766, 2020.

KARASAWA, H.; TAKETO, M. M.; MATSUI, M. Loss of anti-cataleptic effect of scopolamine in mice lacking muscarinic acetylcholine receptor subtype 4. **European journal of pharmacology**, v. 468, n. 1, p. 15–19, 2003.

KISS, J. Nitric oxide: a novel link between synaptic and nonsynaptic transmission. **Trends in neurosciences**, v. 24, n. 4, p. 211–215, 2001.

LATTANZI, S. et al. Efficacy and safety of perampanel in Parkinson's disease. A systematic review with meta-analysis. **Journal of neurology**, v. 265, n. 4, p. 733–740, 2018.

LETA, V. et al. Can therapeutic strategies prevent and manage dyskinesia in Parkinson's disease? An update. **Expert opinion on drug safety**, v. 18, n. 12, p. 1203–1218, 2019.

LIU, M. et al. Isoflurane conditioning-induced delayed cerebral ischemia protection in subarachnoid hemorrhage—role of inducible nitric oxide synthase. **Journal of the American Heart Association**, v. 12, n. 14, 2023.

MATTOS J. P.; MATTOS V. M. B. C. Novos agonistas dopaminérgicos. **Arq. Neuropsiquiatric**. 1999; 57(2):329-32.

MAYORGA, A. J. et al. Characterization of the muscarinic receptor subtype mediating pilocarpine-induced tremulous jaw movements in rats. **European journal of pharmacology**, v. 364, n. 1, p. 7–11, 1999.

MENESES, M. S.; TEIVE, H. A. G. Doença de Parkinson: aspectos clínicos e cirúrgicos. Rio de Janeiro: Ganabara-Koogan, 2003.

MOEHLE, M. S. et al. Discovery of the first selective M4 muscarinic acetylcholine receptor antagonists with in vivo antiparkinsonian and antidystonic efficacy. **ACS pharmacology & translational science**, v. 4, n. 4, p. 1306–1321, 2021.

MOEHLE, M. S.; CONN, P. J. Roles of the M4 acetylcholine receptor in the basal ganglia and the treatment of movement disorders. **Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society**, v. 34, n. 8, p. 1089–1099, 2019.

MORAN, S. P.; MAKSYMETZ, J.; CONN, P. J. Targeting muscarinic acetylcholine receptors for the treatment of psychiatric and neurological disorders. **Trends in pharmacological sciences**, v. 40, n. 12, p. 1006–1020, 2019.

NASU, R. et al. Quantitative prediction of catalepsy induced by amoxapine, cinnarizine and cyclophosphamide in mice. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 21, n. 4, p. 129–138, 2000.

NOWACZYK, A. et al. Carbon monoxide and nitric oxide as examples of the youngest class of transmitters. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 11, p. 6029, 2021.

OBESO JA, OLANOW CW, Nutt JG. Levodopa motor complications in Parkinson's disease. **Trends Neurosci.** 2000;23(10 Suppl):S2-S7.

**Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS).** Disponível em: <https://www.paho.org/pt>. Acesso em: 24 July 2021.

OSSOWSKA, K. et al. The influence of dizocilpine (MK-801) on the reserpine-enhanced electromyographic stretch reflex in rats. **Neuroscience letters**, v. 203, n. 2, p. 73–76, 1996.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 927–935, 2009.

PARDO, M. et al. The non-selective adenosine antagonist theophylline reverses the effects of dopamine antagonism on tremor, motor activity and effort-based decision-making. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 198, n. 173035, p. 173035, 2020.

PITSIKAS, N. The role of nitric oxide synthase inhibitors in schizophrenia. **Current medicinal chemistry**, v. 23, n. 24, p. 2692–2705, 2016.

PONTONE, G. M. et al. 'Anxious fluctuators' a subgroup of Parkinson's disease with high anxiety and problematic on-off fluctuations. **Parkinsonism & related disorders**, v. 105, p. 62–68, 2022.

QUINN NP. Classification of fluctuations in patients with Parkinson's disease. **Neurology.** 1998;51(2 Suppl 2):S25-S29

SAMMUT, S. et al. Phasic dopaminergic transmission increases NO efflux in the rat dorsal striatum via a neuronal NOS and a dopamine D1/5 receptor-dependent mechanism. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 31, n. 3, p. 493–505, 2006.

SANBERG, P. R. et al. The catalepsy test: Its ups and downs. **Behavioral neuroscience**, v. 102, n. 5, p. 748–759, 1988.

SANTIAGO, M. P.; POTTER, L. T. Biotinylated m4-toxin demonstrates more M4 muscarinic receptor protein on direct than indirect striatal projection neurons. **Brain research**, v. 894, n. 1, p. 12–20, 2001.

SANTOS, G.; LOUREIRO, L. Nitrate: suplementação, fontes dietéticas e efeitos na performance - Nitrate: supplementation, dietary sources and effects on performance. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, p. 7–16, 2017.

SHIH MC, et al. Neuroimagem do transportador de dopamina na doença de Parkinson: Primeiro estudo com [99mTc]-TRODAT-1 e SPECT no Brasil. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, 2006; 64(3-A): 628-34.

SILVERDALE, M. A. et al. Potential nondopaminergic drugs for Parkinson's disease. **Advances in neurology**, v. 91, p. 273–291, 2003.

STARR, M. S.; STARR, B. S. Do NMDA receptor-mediated changes in motor behaviour involve nitric oxide? **European journal of pharmacology**, v. 272, n. 2–3, p. 211–217, 1995.

SZLAS, A.; KUREK, J. M.; KREJPCIO, Z. The potential of L-arginine in prevention and treatment of disturbed carbohydrate and lipid metabolism-A review. **Nutrients**, v. 14, n. 5, p. 961, 2022.

TEIVE, H. A. G. Etiopatogenia. In: FERRAZ, H. B. Doença de Parkinson: prática clínica e terapêutica. São Paulo, SP: Atheneu, 2005. p. 37-57.

THANVI, B.; LO, N.; ROBINSON, T. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: clinical features, pathogenesis, prevention and treatment. **Postgraduate medical journal**, v. 83, n. 980, p. 384–388, 2007.

**The Michael J. fox Foundation for Parkinson's research.** Disponível em: <<https://www.michaeljfox.org/>>. Acesso em: 24 July 2021.

THOMSEN, M.; SØRENSEN, G.; DENCKER, D. Physiological roles of CNS muscarinic receptors gained from knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 136, n. Pt C, p. 411–420, 2018.

TREVITT, J. et al. Adenosine antagonists reverse the cataleptic effects of haloperidol: Implications for the treatment of Parkinson's disease. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 92, n. 3, p. 521–527, 2009.

VALEEV, V. V. et al. Pathophysiological and clinical aspects of using L-arginine in cardiology and angiology. **Angiologiia i sosudistaia khirurgiia [Angiology and vascular surgery]**, v. 22, n. 3, p. 9–15, 2016.

WADENBERG, M. Dopamine D2 receptor occupancy is a common mechanism underlying animal models of antipsychotics and their clinical effects. **Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 5, p. 633–641, 2001.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological bulletin**, v. 83, n. 3, p. 482–504, 1976.

WANG, J. et al. The structural study of mutation-induced inactivation of human muscarinic receptor M4. **IUCrJ**, v. 7, n. 2, p. 294–305, 2020.

WEST, A. R.; GRACE, A. A. Striatal nitric oxide signaling regulates the neuronal activity of midbrain dopamine neurons in vivo. **Journal of neurophysiology**, v. 83, n. 4, p. 1796–1808, 2000.

**What is Parkinson's?** Disponível em: <<https://www.parkinson.org/understanding-parkinsons/what-is-parkinsons>>. Acesso em: 24 July 2021.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. **Journal of comparative and physiological psychology**, v. 63, n. 3, p. 500–504, 1967.

ZARRINDAST, M. R.; MODABBER, M.; SABETKASAI, M. Influences of different adenosine receptor subtypes on catalepsy in mice. **Psychopharmacology**, v. 113, n. 2, p. 257–261, 1993.

ZEMBA CILIC, A. et al. Pentadecapeptide BPC 157 counteracts L-NAME-induced catalepsy. BPC 157, L-NAME, L-arginine, NO-relation, in the suited rat acute and chronic models resembling 'positive-like' symptoms of schizophrenia. **Behavioural brain research**, v. 396, n. 112919, p. 112919, 2021.



## ANEXO A



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “Análise da interação entre acetilcolina, dopamina e óxido nítrico sobre o comportamento motor em um modelo animal da doença de parkinson”, registrada com o nº 1.237/2022, sob a responsabilidade de **Albert Schiaveto de Souza** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/UFMS) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, em reunião de 06/07/2022.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/10/2022 a 04/04/2024
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongos Suíços
Nº de animais	96
Peso/Idade	30 g / 60 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMS

Fábio José Carvalho Faria  
Coordenador da CEUA/UFMS  
Campo Grande, 12 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Fabio Jose Carvalho Faria, Presidente de Comissão**, em 12/07/2022, às 19:29, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).