

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

SUELEN LÚCIO BOSCHEN

ANTIPSIKÓTICO TÍPICO PRODUZ EFEITOS AMNÉSICOS PELO BLOQUEIO DE RECEPTORES D2 PÓS-SINÁPTICOS NO ESTRIADO DORSOLATERAL DE RATOS, MAS NÃO AFETA A DESSENSIBILIZAÇÃO DE RECEPTORES D2 PRÉ-SINÁPTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS EM MODELO ANIMAL DE ESQUIZOFRENIA.

CURITIBA

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

SUELEN LÚCIO BOSCHEN

**ANTIPSICÓTICO TÍPICO PRODUZ EFEITOS AMNÉSICOS PELO BLOQUEIO DE
RECEPTORES D2 PÓS-SINÁPTICOS NO ESTRIADO DORSOLATERAL DE RATOS,
MAS NÃO AFETA A DESSENSIBILIZAÇÃO DE RECEPTORES D2 PRÉ-
SINÁPTICOS NO NÚCLEO ACCUMBENS EM MODELO ANIMAL DE
ESQUIZOFRENIA.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio da Cunha

CURITIBA

2015

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Boschen, Suelen Lúcio

Antipsicótico típico produz efeitos amnésicos pelo bloqueio de receptores D2 pós-sinápticos no estriado dorsolateral de ratos, mas não afeta a dessensibilização de receptores D2 pré-sinápticos no núcleo accumbens em modelo animal de esquizofrenia. / Suelen Lúcio boschen. – Curitiba, 2015.

107 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Cláudio da Cunha

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

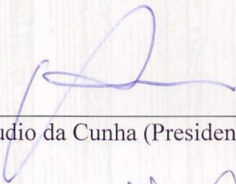
1. Esquizofrenia 2. Antipsicóticos 3. Amnésia I. Título II. Cunha, Cláudio da III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 616.8982
616.8918

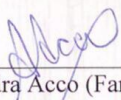


PARECER


A Comissão Examinadora da Tese de Doutorado intitulada “**Antipsicótico típico produz efeitos amnésicos pelo bloqueio de receptores D2 pós-sinápticos no estriado dorsolateral de ratos, mas não afeta a dessensibilização de receptores D2 pré-sinápticos no núcleo accumbens em modelo animal de esquizofrenia**”, de autoria da pós-graduanda SUELEN LUCIO BOSCHEN, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha e banca composta por: Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente – Farmacologia – UFPR), Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Romulo Antonio Fuentes Flores (Universidad de Chile), Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia – UFPR) e Prof. Dr. Sérgio Teixeira Ferreira (Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ), reuniu-se e de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi aprovada. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas pelo seu orientador. Em Curitiba, 22 de janeiro de 2015.



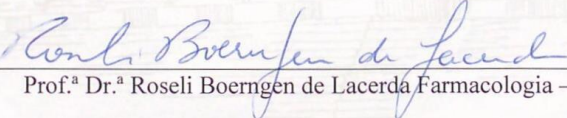
Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente – Farmacologia – UFPR)



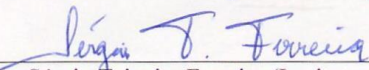
Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Romulo Antonio Fuentes Flores (Universidad de Chile)



Prof.^a Dr.^a Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia – UFPR)

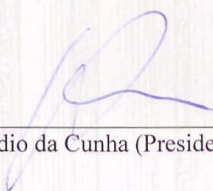


Prof. Dr. Sérgio Teixeira Ferreira (Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ)

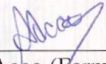


1 **ATA DO JULGAMENTO DA 34ª DEFESA DE TESE DE DOUTORADO**

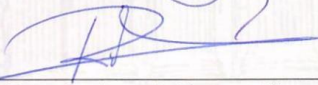
2 Ao vigésimo segundo dia do mês de janeiro do ano de dois mil e quinze, às treze horas,
3 no Auditório do Departamento de Farmacologia, Anexo I, do Setor de Ciências Biológicas
4 da Universidade Federal do Paraná, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese de
5 Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, de autoria da pós-graduanda
6 SUELEN LUCIO BOSCHEN, intitulada “**Antipsicótico típico produz efeitos amnésicos**
7 **pelo bloqueio de receptores D2 pós-sinápticos no estriado dorsolateral de ratos, mas**
8 **não afeta a dessensibilização de receptores D2 pré-sinápticos no núcleo accumbens**
9 **em modelo animal de esquizofrenia**”, sob orientação do Prof. Dr. Cláudio da Cunha e
10 banca composta por: Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente – Farmacologia – UFPR),
11 Prof.ª Dr.ª Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR), Prof. Dr. Romulo Antonio Fuentes
12 Flores (Universidad de Chile), Prof.ª Dr.ª Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia –
13 UFPR) e Prof. Dr. Sérgio Teixeira Ferreira (Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ). A
14 Banca Examinadora iniciou os trabalhos e a candidata teve quarenta e cinco minutos para
15 expor oralmente seu trabalho, sendo em seguida arguida durante quinze minutos por cada
16 um dos membros da Banca, e tendo trinta minutos para responder a cada uma das
17 arguições. No final a Comissão Examinadora emitiu o seguinte parecer:
18 APROVADA. Para a publicação o trabalho deverá sofrer as modificações
19 sugeridas que serão conferidas por seu orientador. Nada mais havendo a tratar, o
20 Presidente deu por encerrada a sessão, da qual foi lavrada a presente ata que será assinada
21 pelo Presidente e pelos demais membros da Comissão Examinadora, em Curitiba, 22 de
22 janeiro de 2015.



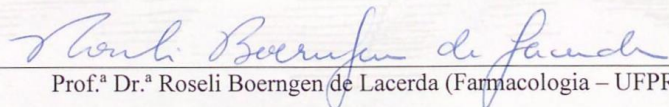
Prof. Dr. Cláudio da Cunha (Presidente – Farmacologia – UFPR)



Prof.ª Dr.ª Alexandra Acco (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Romulo Antonio Fuentes Flores (Universidad de Chile)



Prof.ª Dr.ª Roseli Boerngen de Lacerda (Farmacologia – UFPR)



Prof. Dr. Sérgio Teixeira Ferreira (Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus avós, Demétrio e Maria!
Seu amor, cuidado e confiança me fizeram chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus e Nossa Senhora Aparecida por todas as bênçãos, proteção e oportunidades que continuamente derramam sobre minha vida.

Agradeço ao meu marido Luciano, companheiro inseparável, pelo apoio, confiança e incentivo ao longo de toda minha caminhada. Sua compreensão e sua força serão sempre meus alicerces!

Agradeço aos meus queridos pais, Ivo e Rogéria, pelo amor incondicional e por serem meu porto-seguro em meio às tempestades. A história de vocês me motiva a buscar sempre mais de mim mesma. Tenho muito orgulho de vocês!

Não poderia deixar de agradecer ao professor Claudio, que mais do que orientador, foi meu *mestre, amigo e inspiração*. Sempre levarei comigo seus ensinamentos e conselhos!

Agradeço também ao meu orientador do doutorado-sanduíche, Charles D. Blaha, pela terna receptividade em seu laboratório em Memphis - EUA. Sem sua experiência e atenção este trabalho estaria incompleto!

À minha irmã, Danielle, aos meus cunhados e sobrinhos por todos os momentos de distração.

À Alice Burns, minha grande amiga, mãe e avó! Sua doçura e carinho me fazem uma pessoa melhor.

A todos os professores do departamento de Farmacologia, especialmente aos professores Roberto Andreatini, Maria Vital e Roseli Boerngen, que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação pessoal e profissional.

A todos os meus colegas de pós-graduação, especialmente aos alunos egressos e atuais do prof. Claudio, por tornarem o ambiente de trabalho um local agradável e divertido, repleto de oportunidades e realizações.

Aos membros da banca pela aceitação e valiosa contribuição para o enriquecimento desse trabalho.

Às funcionárias do departamento de Farmacologia, Ely, Patrícia, Gisele, Nair e Dolores, por todo auxílio e atenção.

A CAPES, CNPq e Fundação Araucária pelo financiamento desse estudo.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

Isaac Newton

RESUMO

A esquizofrenia é um transtorno mental tipicamente caracterizado pelo quadro psicótico representado por delírios e alucinações. Sua causa está associada ao aumento da dopamina (DA) mesolímbica e da expressão de receptores D2 estriatais, os quais constituem o principal alvo terapêutico do tratamento com antipsicóticos. Os antipsicóticos típicos são muito efetivos na redução dos sintomas psicóticos, porém apresentam efeitos amnésicos significativos que dificultam a adesão dos pacientes ao tratamento. Por esta razão, a compreensão dos mecanismos pelos quais os antipsicóticos típicos atuam na produção dos seus efeitos pode favorecer a descoberta de alvos terapêuticos mais efetivos no tratamento dessa doença. Nesta tese, investigamos o papel dos receptores dopaminérgicos D2 pré- e pós-sinápticos do DLS no aprendizado e memória de respostas condicionadas de esquiva (CAR); e o papel dos autoreceptores D2 na regulação da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica. A administração de uma dose pré- e pós-sináptica, mas não pré-sináptica, do antipsicótico típico sulpiride foi amnésica sobre CAR. Esse efeito foi revertido pela infusão intra-DLS do agonista D2 quimpirole em uma dose que não afetou o aprendizado e memória de CAR *per se*. Esses resultados mostram que o bloqueio de receptores D2 pós-sinápticos no DLS é necessário e suficiente para produzir os efeitos amnésicos dos antipsicóticos típicos. No segundo estudo, a técnica de amperometria de potencial fixo foi utilizada para evocar a liberação de DA no NAc para avaliar os mecanismos de inibição de liberação de DA e a dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 em um modelo animal de esquizofrenia. As doses sistêmicas pré- e pós-sináptica de sulpiride bloquearam a inibição da liberação de DA. A infusão intra-NAc de quimpirole não afetou a inibição de liberação de DA *per se*, mas reverteu o aumento da DA extracelular induzido por sulpiride. Por outro lado, a dessensibilização de curto-prazo induzida pelo aumento de DA eletricamente evocada não foi afetada por sulpiride ou quimpirole. Portanto, a ativação de autoreceptores D2 inibe a liberação de DA, mas não afeta a dessensibilização de curto-prazo desses receptores. Esses resultados auxiliam no entendimento de como antipsicóticos atuam nos receptores D2 pré e pós-sinápticos estriatais na produção dos seus efeitos terapêuticos e adversos.

ABSTRACT

Schizophrenia is a mental disorder typically characterized by psychotic symptoms such as delusions and hallucinations. Its etiology is associated to increased mesolimbic dopamine (DA) and striatal D2 receptors, which are the main target of antipsychotics treatment. Typical antipsychotics are effective in alleviate psychotic symptoms, but usually present amnesic side effects that difficult schizophrenic patients adherence to treatment. Hence, understanding how typical antipsychotics promote their effects may help discovery of new and more effective treatments. Here, we investigated the role of DLS pre- and postsynaptic D2 dopaminergic receptors in conditioned avoidance response (CAR) learning and memory; and the role of NAc presynaptic D2 receptors in the regulation of the mesolimbic dopaminergic neurotransmission. Systemic administration of pre- and postsynaptic, but not presynaptic, dose of the typical antipsychotic sulpiride was amnesic over CAR. Such effect was reverted by intra-DLS infusion of the D2 agonist quinpirole in a dose that did not affect CAR learning and memory *per se*. These results show that blockade of postsynaptic D2 receptors in the DLS is necessary and sufficient to produce the amnesic effect of typical antipsychotics. In the second study, fixed potential amperometry was used to electrically evoke DA release in the NAc to evaluate the mechanisms of DA release inhibition and D2 autoreceptors short-term desensitization in a schizophrenia animal model. Systemic presynaptic and pre- and postsynaptic doses of sulpiride blocked DA release inhibition. Intra-NAc quinpirole did not affect DA release inhibition *per se*, but reverted the increased extracellular DA induced by sulpiride. On the other hand, D2 autoreceptor short-term desensitization induced by electrically evoked DA was not affected by sulpiride or quinpirole. Therefore, activation of D2 autoreceptors regulates DA release from presynaptic terminals but does not induce short-term desensitization of D2 autoreceptors. Results presented in this thesis help understanding how antipsychotics act on pre- and postsynaptic striatal D2 receptors to yield their therapeutics and adverse effects.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	-	3',5' – adenosina monofosfato cíclico
ATV	-	Área tegmentar ventral
CAR	-	Resposta condicionada de esquiva (do inglês <i>conditioned avoidance response</i>)
CS	-	Estímulo condicionado (do inglês <i>conditioned stimulus</i>)
D2L	-	Isoforma longa dos receptores dopaminérgicos D2
D2S	-	Isoforma curta dos receptores dopaminérgicos D2
DA	-	Dopamina
DAT	-	Transportador de dopamina (do inglês <i>dopamine transporter</i>)
DIR	-	reversão de inibição de DA (do inglês <i>DA inhibition reversal</i>)
DLS	-	Estriado dorsolateral (do inglês <i>dorsolateral striatum</i>)
DSM-V	-	Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
EC	-	Estímulo condicionante
EP	-	Núcleo entopeduncular
FPM	-	Feixe prosencefálico medial
GPe	-	Globo pálido externo
GPi	-	Globo pálido interno
LTD	-	Depressão de longo prazo (do inglês <i>long-term depression</i>)
LTP	-	Potenciação de longo prazo (do inglês <i>long-term potentiation</i>)
MSN	-	Neurônio espinhoso médio (do inglês <i>medium spiny neuron</i>)
NAc	-	Núcleo accumbens
NB	-	Núcleos da base
NST	-	Núcleo subtalâmico
SNc	-	Substância negra <i>pars compacta</i>
SNr	-	Substância negra <i>pars reticulata</i>
S-R	-	Estímulo-resposta (do inglês <i>stimulus-response</i>)
US	-	Estímulo incondicionado (do inglês <i>unconditioned stimulus</i>)

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	xv
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1. ESQUIZOFRENIA.....	15
1.2. AS VIAS DOPAMINÉRGICAS E SUAS IMPLICAÇÕES NA ESQUIZOFRENIA.....	17
1.3. O PAPEL DO ESTRIADO NA SELEÇÃO DE AÇÕES.....	19
1.4. OS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS	25
1.5. MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA	26
1.6. A APRENDIZAGEM INSTRUMENTAL NA ESQUIZOFRENIA	28
2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES.....	30
3 OBJETIVO GERAL	32
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 METODOLOGIA	33
4.1 EXPERIMENTO 1	33
4.1.1. Animais	33
4.1.2. Cirurgia para implantação de cânulas	33
4.1.3. Drogas e Grupos Experimentais.....	34
4.1.4. Esquiva Ativa de Duas Vias.....	35
4.1.5. Histologia.....	37
4.1.6. Análise Estatística	37
4.2 EXPERIMENTO 2.....	37
4.2.1. Animais.....	37
4.2.2. Amperometria de Potencial Fixo.....	38
4.2.3. Inibição e dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 por estímulo condicionante (EC).....	39
4.2.4. Materiais e desenho experimental	40
4.2.5. Histologia.....	41
4.2.6. Análise Estatística	41
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS	43

5.1 ACTIVATION OF POSTSYNAPTIC D2 DOPAMINE RECEPTORS IN THE RAT DORSOLATERAL STRIATUM PREVENTS THE AMNESTIC EFFECT OF SYSTEMICALLY ADMINISTERED NEUROLEPTICS	43
5.2 ACTIVATION DOES NOT DESENSITIZE D2 AUTORECEPTORS.....	66
6 DISCUSSÃO GERAL	85
7 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

APRESENTAÇÃO

Esta tese apresenta os resultados na forma de artigos científicos nos quais encontram-se descritos os seguintes itens: Resultados, Discussão e Referências.

Na tese, o item 4 – Metodologia engloba os animais e os procedimentos adotados na realização dos dois experimentos que compuseram os artigos científicos apresentados. O item 5 – Discussão Geral apresenta a integração dos resultados descritos nos artigos e sua relevância frente à neurociência na atualidade. No item 6, Conclusões, são apresentadas as conclusões gerais da tese. As Referências Bibliográficas listadas no item 7 referem-se às citações que aparecem na Introdução, Metodologia e na Discussão Geral da tese.

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUIZOFRENIA

A esquizofrenia é um transtorno mental crônico e debilitante que abrange um largo espectro de manifestações clínicas. Afeta aproximadamente 1% da população mundial como uma doença esporádica ou hereditária com sintomas surgindo, em geral, na adolescência ou no início da idade adulta (Mikell *et al.*, 2009; Ginovart e Kapur, 2010; Karam *et al.*, 2010; Del-Monte *et al.*, 2013; Nikolaus *et al.*, 2014).

Tipicamente, essa doença é caracterizada pela ocorrência de delírios (sensações e percepções delirantes como delírios de perseguição ou de grandeza, eco do pensamento, inserção) e alucinações persistentes (visual, auditiva ou olfatória) que podem se apresentar como vozes alucinatórias em que o paciente ouve vozes comentando sobre ele na terceira pessoa. Tal quadro corresponde ao que se denomina sintomas positivos ou psicóticos da esquizofrenia (Ginovart e Kapur, 2010). Ainda podem ser identificadas diversas outras manifestações clínicas que integram os sintomas negativos, como o isolamento social, embotamento emocional, falta de motivação e apatia; e os sintomas cognitivos de prejuízo de atenção, de memória e das funções cognitivas (Mikell *et al.*, 2009; Ginovart e Kapur, 2010; Simpson *et al.*, 2010).

Segundo a última versão do Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-V) da Sociedade Americana de Psiquiatria, ao menos dois dos sintomas descritos acima devem ser apresentados por um mínimo de 6 meses, sendo que um deles deve ser de caráter psicótico (DSM-V, 2013; Araújo e Neto, 2014). Além disso, o diagnóstico da esquizofrenia deve ser feito após exclusão de causas diversas como abuso de substâncias alucinógenas (anfetaminas, cocaína), intoxicações medicamentosas (levodopa, anticolinérgicos), doenças infecciosas, metabólicas ou endócrinas, entre outras (Araújo e Neto, 2014).

O tratamento da esquizofrenia foi centrado inicialmente no controle dos sintomas positivos com o uso dos chamados antipsicóticos típicos, como a clorpromazina. Contudo, essas drogas produzem intensas reações adversas como sedação, hiperprolactinemia e efeitos parkinsonianos importantes, como distonia e acatisia. Com o uso prologado, também podem provocar discinesia tardia, um efeito adverso potencialmente irreversível caracterizado por contrações musculares involuntárias e repetitivas. Além disso, essas drogas possuem efetividade limitada, pois atuam fracamente no alívio dos sintomas negativos e cognitivos. A evolução no tratamento da esquizofrenia se deu com o advento dos antipsicóticos atípicos, como a clozapina, por possuírem menor risco de causar efeitos parkinsonianos e de hiperprolactinemia (Ginovart e Kapur, 2010). Sugeriu-se que essas drogas possuiriam melhor atividade no controle dos efeitos negativos e cognitivos da esquizofrenia (Kane et al., 1988; Buchanan, 1995), entretanto tal eficácia não foi comprovada por diversos outros estudos (Arvanitis e Miller, 1997; Peuskens e Link, 1997; Copolov et al., 2000). Assim, os antipsicóticos atípicos oferecem apenas uma modesta superioridade no tratamento clínica da esquizofrenia em relação aos antipsicóticos típicos.

A etiologia da esquizofrenia ainda é obscura, porém evidências sugerem que fatores genéticos e ambientais agem em conjunto: se uma predisposição genética subsiste, a doença pode ser desencadeada por estressores ambientais, psicológicos ou biológicos (Brown, 2011; Nikolaus *et al.*, 2014).

Há muito foi sugerido que disfunções dopaminérgicas seriam responsáveis pela patogênese da esquizofrenia (Heinz e Schlagenhauf, 2010; Howes e Kapur, 2009). Inicialmente, observações clínicas relataram a melhora dos sintomas psicóticos com o tratamento com antagonistas de receptores dopaminérgicos D2. Surgiu, então, a hipótese dopaminérgica da esquizofrenia em que uma superestimulação dos receptores dopaminérgicos poderia ter uma relação causal com a doença (Lieberman *et al.*, 1987; Seeman, 2013; Nikolaus *et al.*, 2014). De fato, todas as drogas estabelecidas até o momento para o tratamento de esquizofrenia são, em certo grau, antagonistas dos receptores dopaminérgicos da família D2 (Seeman, 2006; Mikell *et al.*, 2009; Simpson *et al.*, 2010).

Recentemente novos estudos sugeriram uma modificação da hipótese dopaminérgica, segundo a qual, haveria além da hiperatividade da dopamina na via mesolímbica, importante para o surgimento dos sintomas positivos, uma redução da atividade dopaminérgica no córtex pré-frontal que contribuiria para o surgimento dos sintomas cognitivos (Simpson *et al.*, 2010) e negativos (Howes e Kapur, 2009). Porém, uma proposta mais recente mostra evidências de que ocorre, no curso inicial da doença, um aumento na concentração extrasináptica de dopamina estriatal e no número de receptores dopaminérgicos D2 estriatais. Esta hiperatividade dopaminérgica estriatal promove mudanças compensatórias tardias no córtex pré-frontal durante a progressão da doença e são mantidas mesmo após o tratamento com antipsicóticos (Simpson *et al.*, 2010).

Como os receptores D2 estão predominantemente localizados no estriado dorsal e no núcleo accumbens (NAc), a principal conexão causal proposta relaciona a hiperatividade dopaminérgica na via mesolímbica e o desenvolvimento dos sintomas esquizofrênicos (Nikolaus *et al.*, 2014).

1.2 AS VIAS DOPAMINÉRGICAS E SUAS IMPLICAÇÕES NA ESQUIZOFRENIA

Existem quatro principais vias dopaminérgicas. São elas: (i) a via tuberoinfundibular, cujas fibras nervosas se projetam do hipotálamo para a hipófise anterior. (ii) A via nigroestriatal, com os corpos celulares na substância negra *pars compacta* (SNc) e os terminais dopaminérgicos no estriado dorsal. (iii) A via mesolímbica, com fibras que projetam-se da área tegmentar ventral (ATV) para o estriado ventral – (o que inclui o NAc), para o núcleo caudado e para estruturas do sistema límbico como o hipocampo e a amígdala. E finalmente, (iv) a via mesocortical que tem projeções da ATV para o córtex pré-frontal (Stahl, 2008).

A participação das vias nigroestriatal e tuberoinfundibular na esquizofrenia está associada mais especificamente ao surgimento de reações adversas ao uso de drogas

antipsicóticas. O bloqueio de receptores dopaminérgicos D2 na via nigroestriatal contribui respectivamente para o desenvolvimento de sinais motores de parkinsonismo como a rigidez muscular, acinesia ou bradicinesia, acatisia e distonia. O bloqueio da via tuberoinfundibular pelos antipsicóticos causa como efeitos colaterais a ginecomastia e a galactorréa (Roth e Rogan, 2010).

As vias mesolímbica e mesocortical estão criticamente relacionadas com o processamento e regulação de estímulos emocionais e à flexibilidade comportamental. A via mesolímbica, em especial, é considerada como um sistema neural crítico para o processamento de informações hedônicas com saliência motivacional, tais como, o consumo de drogas de abuso e os estímulos apetitivos os quais funcionam como reforçadores naturais (Krindgelbach e Berridge, 2009; Laviolette, 2007).

É amplamente conhecido que a aprendizagem de comportamentos motivados depende da ativação das vias dopaminérgicas mesolímbica e nigroestriatal (Wendler *et al.*, 2014; Wietzikoski *et al.*, 2012; Miyoshi *et al.*, 2012; Boschen *et al.*, 2011; Bortolanza *et al.*, 2010; Da Cunha *et al.*, 2003; Da Cunha *et al.*, 2002). Quando o cérebro não codifica adequadamente o valor emocional de um estímulo sensorial, há uma grande dificuldade em se elaborar comportamentos adaptativos motivados por estes estímulos (Laviolette, 2007). Ou seja, o aprendizado de novos comportamentos frente a estímulos salientes do ambiente fica prejudicado (Wendler *et al.*, 2014; Wietzikoski *et al.*, 2012; Boschen *et al.*, 2011).

Na esquizofrenia, a apatia é uma complexa manifestação sintomática que prevalece mesmo em pacientes sob tratamento com antipsicóticos (Raffard *et al.*, 2013). Em termos gerais, a apatia pode ser caracterizada como uma síndrome tridimensional (cognitiva, sensório-motora e afetiva) (Del-Monte *et al.*, 2013) com intensa falta de interesse ou de motivação por atividades pessoais e sociais e também por uma perda na capacidade de responder a reforçadores positivos (eventos gratificantes) e a reforçadores negativos (interrupção de um evento aversivo) (Van Reekum *et al.*, 2005; Del-Monte *et al.*, 2013). O funcionamento anormal nas vias dopaminérgicas relacionadas a esquizofrenia e ao seu tratamento gera distúrbios no

processamento, percepção e regulação emocional que culmina no surgimento e agravamento da apatia (Kirkpatrick, 2014; Raffard *et al.*, 2013).

1.3 O PAPEL DO ESTRIADO NA SELEÇÃO DE AÇÕES

As vias dopaminérgicas constituem o principal modulador dos núcleos da base (NB), o sistema neural responsável pela seleção de ações (Redgrave *et al.*, 2008). Esses processos de seleção de comportamento incluem a escolha e a iniciação de ações motoras voluntárias. Tais decisões são aprendidas e armazenadas na forma de memórias procedurais (Da Cunha *et al.*, 2009).

Os NB são formados pelo corpo estriado e globo pálido, partes externa (GPe) e interna (GPi). Devido a suas ligações funcionais com esses núcleos, o núcleo subtalâmico (NST) e a substância negra também são considerados estruturas associadas aos NB (Parent e Hazrati, 1995). Esse grupo de estruturas forma uma complexa rede de interconexões e é responsável pela integração de sinais originados de todas as regiões do neocórtex. O resultado desse processamento é direcionado (via tálamo) ao córtex frontal para auxiliá-lo na tomada de decisões sobre qual ação motora deve ser iniciada (DeLong e Wichmann, 2007).

O corpo estriado e o NST são as portas de entrada dos NB. O estriado é, ainda, o centro de integração dos NB, recebendo aferências corticais, que são excitatórias e mediadas pelo neurotransmissor glutamato. As projeções estriatais são compostas por duas subpopulações de neurônios GABAérgicos espinhosos médios (MSNs, do inglês *medium spine neurons*) que selecionam a ação motora apropriada: as vias direta e indireta (Alexander *et al.*, 1986). Essas vias podem ser identificadas pela expressão diferencial de receptores dopaminérgicos. Os receptores dopaminérgicos D1 são expressos na via direta, enquanto os receptores dopaminérgicos D2 são expressos na via indireta (Gerfen *et al.*, 1990). A via direta apresenta conexões inibitórias monossinápticas com o GPi e a substância negra *pars reticulata* (SNr) (em roedores,

núcleo entopeduncular – EP); e a via indireta faz projeções polisinápticas com o GPe e o NST (DeLong e Wichmann, 2007).

As projeções GABAérgicas do GPi e da SNr estão tonicamente ativas mantendo assim os seus núcleos de projeção (os núcleos ventroanterior, ventrolateral e intralaminar do tálamo e outros centros motores do tronco encefálico) tonicamente inibidos. A ativação seletiva de MSNs da via direta inibe o GPi e SNr, culminando na remoção da inibição tônica de neurônios do tálamo que, uma vez desinibidos, iniciam uma ação específica codificada no córtex motor. Por outro lado, a ativação de MSNs da via indireta remove a inibição que o GPe exerce sobre o GPi e SNr; isso resulta em uma inibição maior e generalizada dos núcleos motores talâmicos, inibindo assim que outros programas motores sejam iniciados concomitantemente com a ação motora escolhida (Figura 1) (DeLong e Wichmann, 2007; Cui *et al.*, 2013).

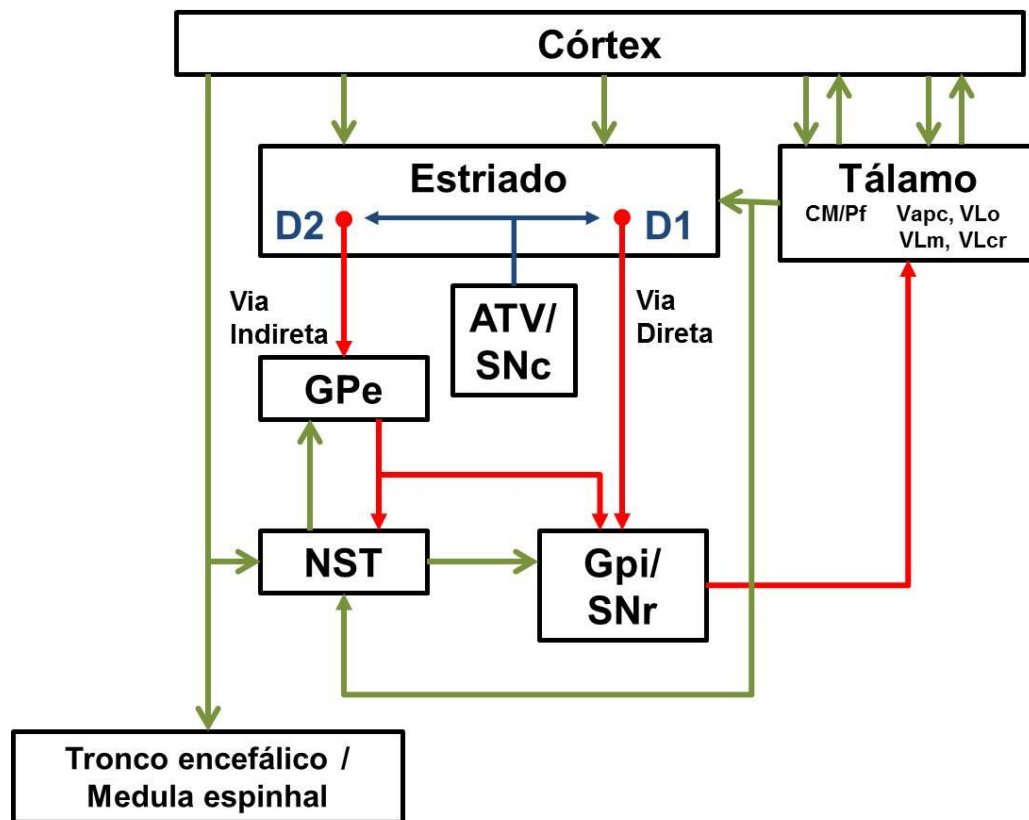


FIGURA 1. Diagrama das principais conexões dos núcleos da base indicando as vias direta e indireta. As setas vermelhas indicam projeções GABAérgicas, setas verdes projeções glutamatérgicas e setas azuis projeções dopaminérgicas. Abreviações: ATV, área tegmentar ventral; CM, núcleo centromedial; GPe, globo pálido externo; GPi, globo pálido interno; Pf, núcleo parafascicular; SNc, substância negra *pars compacta*; SNr, substância negra *pars reticulata*; NST, núcleo subtalâmico; VApC, núcleo ventroanterior

pars parvocellularis; VLm, núcleo ventrolateral *pars medialis*; VLo, núcleo ventrolateral *pars oralis*; VLcr, núcleo ventrolateral rostral *pars caudalis*.

FONTE: Adaptado de DeLong e Wichmann (2007) e Cui *et al.* (2013).

Apesar da ausência de evidências diretas, acredita-se que a ação combinada das vias direta e indireta seja necessária para a seleção de ações motoras específicas, tal como proposto acima (Mink e Thach, 1991; Fukabori *et al.*, 2012; Cui *et al.*, 2013).

Sabe-se ainda que a atividade neuronal no estriado dorsal sofre alterações de plasticidade sináptica durante a aquisição de memórias de procedimentos (Calabresi *et al.*, 2007; Aceves *et al.*, 2011). O balanço entre essas vias é modulado pelas ações diferenciais da densa inervação dopaminérgica que advém das vias nigroestriatal e mesolímbica (Bolam *et al.*, 2000). A elevação dos níveis de DA estriatal aumenta a atividade na via direta, via ativação de receptores D1, e reduz atividade na via indireta, via ativação de receptores D2. Este *input* dopaminérgico é crítico para o funcionamento normal do estriado e dos NB (Gerfen e Surmeier, 2011). Juntos, esses mecanismos resultam na redução global de atividade do GPi e SNr, com consequente ativação das projeções tálamo-corticais específicas para a iniciação de uma ação motora. Por outro lado, a redução da DA estriatal aumenta a atividade do GPi e SNr, aumentando assim a inibição dos núcleos talâmicos motores (DeLong e Wichmann, 2007; Gerfen e Surmeier, 2011).

O estriado é a principal estrutura que medeia processos de aquisição de memórias de procedimentos que são expressas na forma de respostas condicionadas ou de ações e respostas instrumentais (Knowlton *et al.*, 1996; Graybiel, 2005; Hikosaka *et al.*, 2008; Doyon *et al.*, 2009; Fukabori *et al.*, 2012). Uma ação ou resposta motora é considerada instrumental quando resulta em uma consequência gratificante ou evita uma consequência aversiva. Uma resposta é considerada condicionada quando é iniciada por um estímulo neutro que durante o processo de aprendizagem foi pareado com um estímulo apetitivo ou aversivo.

Pesquisas sobre como os NB medeiam o processo de escolher ações em resposta a estímulos ambientais que sinalizam uma consequência é uma área da

neurociência muito estudada. De acordo com o modelo do “mosaico dos espelhos quebrados”, proposto pelo nosso grupo de pesquisa, projeções do córtex para o estriado associam a representação de um estímulo condicionado com a deflagração de uma resposta ou ação motora específica. Isso ocorre porque os MSNs do estriado formam unidades sensoriomotoras capazes de iniciar ações de uma parte do corpo direcionadas a um objeto ou uma ação de locomoção direcionada a um lugar específico. Cada vez que a escolha de uma ação que resulta em algo melhor que o esperado ocorre, há uma liberação fásica de dopamina que contribui para o fortalecimento das sinapses entre os neurônios corticoestriatais que estão ativos. No caso, serão fortalecidas as sinapses entre os neurônios corticoestriatais que foram ativadas para escolher a ação reforçada. (Da Cunha *et al.*, 2009).

Esse aprendizado depende de alterações na força das sinapses entre os neurônios corticoestriatais e os MSNs no estriado (Beninger, 1983; Calabresi *et al.*, 2007). É o fortalecimento dessas sinapses que forma os traços de memória que aumentam a probabilidade de que uma resposta específica seja determinada por estímulos ambientais incondicionados (aqueles biologicamente relevantes – que produzem respostas emocionais inatas, p.ex. estímulos dolorosos, apetitivos, sexuais, etc), por um estímulo condicionado (a visão ou o som de um objeto, um ambiente específico) ou por um objetivo.

Os mecanismos responsáveis pela formação dos traços de memória no estriado são os fenômenos de plasticidade sináptica chamados potenciação de longo prazo (LTP, do inglês *long-term potentiation*) e depressão de longo prazo (LTD, do inglês *Long-term Depression*). De acordo com a lei de Hebb, ocorre LTP quando neurônios pré- e pós-sinápticos estão simultaneamente despolarizados (Squire e Kandel, 2003). Dessa maneira, a associação entre os estímulos sensoriais e motores, provenientes dos córtices somatossensorial e motor, respectivamente, é adquirida quando a LTP é induzida nas sinapses de ambos os neurônios corticoestriatais com o mesmo MSN no momento em que os três neurônios estão despolarizados ao mesmo tempo. Por exemplo, para aprender a ação de digitar a letra U no teclado do computador com o dedo indicador direito, o neurônio cortical que representa esse dedo, o neurônio que

representa a “tecla U” e o MSN para o qual eles projetam devem estar ativos ao mesmo tempo. Isso leva ao fortalecimento das sinapses entre esses neurônios de forma que a visão da “tecla U” aumenta a probabilidade de que o MSN que libera essa ação seja ativado.

A função da DA em todo este processo de plasticidade sináptica é promover a modulação da mesma, ou seja, aumentar a probabilidade de que o MSN certo seja ativado ao mesmo tempo que o neurônio cortical. Isso corresponde a “imprimir um sinal de aprendizado”, ou seja, avisar quando o aprendizado de uma ação deve ocorrer. Isso ocorre quando a dopamina é liberada no estriado de forma fásica. O disparo fásico dos neurônios dopaminérgicos leva a uma liberação robusta e transitória desse neurotransmissor, cuja função, neste caso, é servir como um sinal de que há algo novo e relevante a ser aprendido (Schultz, 2007). Quando isso acontece, a dopamina fásica promove a LTP na via direta e a LTD na via indireta (Calabresi *et al.*, 2007; Surmeier *et al.*, 2010; Gerfen e Surmeier, 2011). Com isso, diante do mesmo estímulo, a probabilidade de que aquela ação escolhida seja iniciada aumenta porque ela é promovida pela estimulação da via direta (que foi fortalecida) e pela inibição da via indireta (que foi enfraquecida para essa ação) (Di Filippo *et al.*, 2009).

Estudos de Schultz (2007) sugerem que a liberação fásica de DA ocorre em resposta a um estímulo condicionado (gratificante) imprevisível, sendo a quantidade de DA liberada proporcional à diferença entre a recompensa esperada e a recompensa obtida. É o chamado “erro de predição”. Segundo esta teoria, neurônios dopaminérgicos da ATV e SNc disparam fasicamente com aumento da concentração extrasináptica de DA em resposta a estímulos apetitivos, enquanto estes mesmos neurônios sofrem uma inibição da liberação tônica de DA frente a estímulos aversivos (Schultz, 2007). Há também evidências recentes de que outra população de neurônios dopaminérgicos mesencefálicos responde de forma semelhante para estímulos aversivos (Brischoux *et al.*, 2009; Matsumoto e Hikosaka, 2009).

Em um trabalho recente (Dombrowski *et al.*, 2012) mostramos que a liberação de DA no estriado (monitorada por microdiálise *in vivo*) ocorre nas primeiras sessões de treino na tarefa de esquiva ativa de duas vias, quando o animal é surpreendido por

evitar um choque quando executa uma ação instrumental – o que é algo melhor do que o esperado (i.e., um erro de predição positivo). Porém, depois que o animal aprende a prever que o choque pode ser evitado com essa resposta instrumental de esquiva, os mesmos estímulos (choque e som) deixam de causar a liberação de dopamina. No mesmo estudo constatamos também que a aprendizagem de esquiva é proporcional à liberação de DA na primeira sessão de treino, e que animais com lesão na SNc não liberam DA durante todas as sessões de treino e também não aprendem a tarefa. Em outros trabalhos recentes mostramos que a infusão de antagonistas dopaminérgicos D1 ou D2 no núcleo accumbens ou no estriado dorsolateral causam um prejuízo no aprendizado de respostas condicionadas de esquiva (Boschen *et al.*, 2011; Wietzikoski *et al.*, 2012). Esses resultados sugerem fortemente que a DA é liberada no estriado quando há um erro de predição positivo e que ela reforça a associação entre o estímulo condicionado (que sinaliza a consequência) e a resposta instrumental de esquiva.

Além do efeito sobre a aprendizagem, os estímulos condicionados causam uma breve liberação fásica de DA que é necessária para motivar a escolha das ações previamente reforçadas pela liberação fásica de DA (Grace e Bunney, 1984a; Grace e Bunney, 1984b; Zhang *et al.*, 2009). Isso acontece porque, agindo sobre receptores da família D1, a DA fásica excita os MSNs que estão prestes a se despolarizar e inibe os que estão com potencial de membrana mais negativo (porque não foram reforçados previamente) (Augustin *et al.*, 2014; Lovinger, 2010). Além disso, a liberação fásica de DA é necessária para ativar os receptores D2 pós-sinápticos (de baixa afinidade) de forma a inibir os MSNs da via indireta que bloqueiam o início da ação escolhida. A falha desse mecanismo parece estar relacionada a sintomas de hiperatividade motora e impulsividade observados durante os surtos psicóticos. A liberação tônica de uma pequena quantidade de dopamina também exerce um papel importante na prevenção de ações impulsivas, pois os receptores D2 pré-sinápticos (de alta afinidade) inibem a liberação fásica de DA pelos neurônios nigroestriatais e mesolímbicos e na liberação de glutamato pelos neurônios corticoestriatais que estão pouco ativos (Hooper *et al.*, 1997). Esse mecanismo faz com que a DA exerça um papel de filtro sinal-ruído,

aumentando a probabilidade de que a ação certa (aprendida) seja iniciada na hora certa (quando sinalizada por certos estímulos ambientais condicionados e incondicionados).

1.4 OS RECEPTORES DOPAMINÉRGICOS

Tal como mencionado acima, os receptores dopaminérgicos estão classificados em duas famílias: tipo-D1 e tipo-D2. A família D1 inclui os receptores D1 e D5, acoplados à proteína G_s e G_{olf} , que, por aumentar os níveis intracelulares de 3',5'-adenosina monofosfato cíclico (AMPC) culmina com o fechamento de canais de potássio (K^+), facilitando a despolarização celular. Já a família D2 engloba os receptores D2 (incluindo as isoformas curta e longa – D2S e D2L), D3 e D4, acoplados à proteína G_i ou G_o , que, por sua vez, inibe a enzima adenilato ciclase, diminuindo a concentração de AMPC intracelular, promovendo a abertura de canais de potássio no neurônio pós-sináptico e o fechamento de canais de cálcio no neurônio pré-sináptico, resultando na hiperpolarização das células (Missale *et al.*, 1998; Fisone, 2010; Rankin *et al.*, 2010; Gerfen e Surmeier, 2011). As proteínas G_i e G_o também se ligam a canais iônicos dependentes de voltagem e a isoformas da enzima fosfolipase C. Outra característica importante dos receptores do tipo D2 é a sua potente modulação por proteínas reguladoras da sinalização da proteína G (RGS) amplamente expressas nos neurônios estriatais (Gerfen e Surmeier, 2011).

No estriado podem ser encontrados os receptores D1 e D5, D2 e D3, sendo os receptores D2 e D3 localizados tanto na pós-sinapse de MSNs quanto nos terminais pré-sinápticos de neurônios dopaminérgicos, funcionando como autoreguladores inibitórios. Os receptores D2 ainda podem regular a liberação de glutamato dos neurônios corticoestriatais também por sua ação nos terminais pré-sinápticos (Hooper *et al.*, 1997; Missale *et al.*, 1998; Rankin *et al.*, 2010; Gerfen e Surmeier, 2011).

Os receptores D2 e D3 possuem uma homologia bastante acentuada, o que torna difícil a identificação de ligantes específicos a um ou outro subtipo. Ainda assim,

pequenas diferenças de localização e nos mecanismos de sinalização intracelular foram relatadas. Enquanto a distribuição de receptores D2 no estriado é difusa, podendo ser encontrado igualmente no estriado dorsal, núcleo accumbens e tubérculo olfatório, a expressão de receptores D3 é mais restrita ao núcleo accumbens, mesmo que numa concentração 10 vezes menor que a de receptores D2. Como mencionado acima, ambos os subtipos reduzem os níveis intracelulares de AMPc, contudo a inibição promovida por ativação de receptores D3 é muito mais sutil que a de receptores D2 (Rankin *et al.*, 2010).

Uma forma de neutralizar a intensa ativação de receptores D2 e D3 se dá pela conversão desses receptores a uma forma inativa por mecanismos de dessensibilização. Foi verificado que proteínas com atividade fosforilante sobre a proteína G, como a proteína kinase C (PKC), podem fosforilar os receptores D2, diminuindo sua capacidade de reduzir os níveis de AMPc. Isso dificulta que as moléculas receptoras se acoplem a proteína G e promove a internalização de receptores, via arrestinas ou clatrin. Apesar de contar com mecanismos similares, a regulação dos receptores D3 é muito mais sutil que a dos receptores D2 (Rankin *et al.*, 2010). Tais mecanismos não são restritos aos receptores pós-sinápticos presentes nos MSNs, mas também regulam a atividade dos autoreceptores D2 e D3 nos terminais sinápticos dopaminérgicos.

1.5 MODELOS ANIMAIS DE ESQUIZOFRENIA

Modelos animais são boas ferramentas de pesquisa sobre os potenciais mecanismos patogênicos que contribuem para o desenvolvimento do fenótipo esquizofrênico. Os modelos animais de esquizofrenia mais utilizados na neurociência apresentam transmissão dopaminérgica subcortical desregulada. Esse é o caso dos modelos envolvendo lesões hipocâmpais (Chrapusta *et al.*, 2003), ruptura do desenvolvimento cortical pela administração pré-natal do agente metilante – acetato de

metilazoximetanol (Lodge e Grace, 2007; Moore et al., 2006), ou por intervenções imunológicas (Ozawa et al., 2006).

Camundongos da linhagem DBA/2J apresentam características comportamentais e neuroquímicas relevantes para o estudo psico- e fisiológico da esquizofrenia, bem como na investigação de ação antipsicótica de drogas (Singer et al., 2009; Young et al., 2009). Essa linhagem demonstrou uma deficiência intrínseca na tarefa de inibição pré-pulso, um paradigma importante na avaliação de gatilho sensório-motor que é deficiente em pacientes esquizofrênicos. A inibição pré-pulso é comumente demonstrada pela redução na reação de sobressalto dos animais em resposta a um estímulo sonoro de alta intensidade quando é brevemente precedido por um estímulo de baixa intensidade (Hoffman e Searle, 1965).

Os animais DBA/2J, assim como alguns grupos de pacientes esquizofrênicos (Gray et al. 1992), também apresentam prejuízo na tarefa de inibição latente, um paradigma utilizado na avaliação de déficits atencionais relacionados à psicose. Diferente da inibição pré-pulso, a inibição latente avalia uma forma de controle atencional aprendido pela exposição repetida a um estímulo não associado a uma consequência que leva a uma habilidade enfraquecida em associar estímulos significativos de paradigmas pavlovianos ou instrumentais (Lubow e Moore, 1959).

Foi demonstrado que variações nos níveis de receptores D2S e D2L modulam os fenótipos da esquizofrenia (Bertolino et al., 2009) e que os animais dessa linhagem possuem uma redução da razão D2L/D2S no estriado, comparado à linhagem C57 (Colelli et al., 2010). Tal alteração na expressão gênica desses receptores afeta a memória de trabalho, um dos endofenótipos mais associados aos sintomas da esquizofrenia (Bertolino et al., 2009). Além disso, níveis aumentados de DA estriatal foram verificados nos animais dessa linhagem, em comparação outras 14 linhagens de camundongos (Mihre et al., 2005), representando uma hiperatividade dopaminérgica estriatal similar à fisiopatologia da esquizofrenia.

1.6 A APRENDIZAGEM INSTRUMENTAL NA ESQUIZOFRENIA

Como mencionado anteriormente, a esquizofrenia é um distúrbio mental caracterizado pela hiperatividade dopaminérgica estriatal. Recentemente, foram apresentadas evidências de que a desregulação de mecanismos pré-sinápticos está mais relacionada aos distúrbios na função dopaminérgica do que os pós-sinápticos. Assim, o aumento na capacidade de síntese e liberação de DA pode contribuir para a geração dos quadros psicóticos (Ginovart e Kapur, 2010). Sendo assim, investigar os mecanismos que contribuem para a etiologia e sintomatologia, bem como aspectos inerentes ao tratamento da doença são necessários para a melhor compreensão do espectro esquizofrênico. Tal como explicado acima, receptores dopaminérgicos D2 pré- e pós-sinápticos são importantes para controlar a síntese e liberação de DA estriatal, e impedir que ações irrelevantes ou inadequadas sejam iniciadas. A compreensão desses mecanismos em um modelo de esquizofrenia é importante para saber como o bloqueio de receptores D2 pode melhorar ou prejudicar a escolha de ações importantes para promover adaptações ao ambiente, dependendo do seu sítio de expressão (pré- ou pós-sinápticos).

Na esquizofrenia, muitas vezes, o paciente perde esta capacidade de controlar o início ou a finalização de ações inadequadas, assim como de responder a dicas ambientais de que uma determinada ação pode ter uma consequência. Uma estratégia importante para evitar consequências adversas é a aprendizagem da esquiva ativa condicionada, que é a capacidade de responder a dicas ambientais que sinalizam que um evento aversivo é iminente com uma ação motora que seja eficaz para se esquivar de tal evento. Déficits na aprendizagem e expressão de respostas condicionadas de esquiva contribuem para o quadro de apatia que é característico de pacientes esquizofrênicos; infelizmente esse déficit cognitivo não só não responde como também é agravado pelo tratamento com antipsicóticos (Van Reekum *et al.*, 2005; Laviolette, 2007).

Além disso, uma das reações adversas decorrente do tratamento com antipsicóticos típicos é a amnésia decorrente de distúrbios no aprendizado de tarefas instrumentais (Beninger, 2006; Stip, 2006; Beninger *et al.*, 2003). Essas propriedades farmacológicas dos antipsicóticos têm sido utilizadas pela indústria farmacêutica para o *screening* de novos antipsicóticos. Um dos modelos animais utilizados para esse *screening* é a esquiva ativa de duas vias, uma tarefa de respostas condicionadas de esquiva para ratos (Wadenberg, 2010; Wadenberg e Hicks, 1999).

A aprendizagem da esquiva ativa de duas vias envolve a formação de memórias de procedimentos por dois mecanismos de aprendizagem: o condicionamento Pavloviano e o condicionamento instrumental. Em muitas situações os animais podem antecipar a iminência da apresentação de um estímulo reforçador ou aversivo (US, do inglês *unconditioned stimulus*) associando-o a um estímulo neutro que o precede (CS, do inglês *conditioned stimulus*). Este tipo de aprendizagem é chamado de condicionamento clássico ou Pavloviano em homenagem ao pesquisador russo que o descreveu (Pavlov, 1927), e não envolve necessariamente um processo consciente de aprendizado. Uma vez que a associação CS-US foi aprendida, o US pode ser evitado ao emitir uma resposta condicionada de esquiva, antecipando uma resposta de fuga sob a apresentação do CS, que pode ser um sinal auditivo ou visual. A emissão da resposta instrumental para fugir do choque ou antecipar essa ação tão logo seja alertado pelo CS, é caracterizada pelo condicionamento instrumental (Wadenberg e Hicks, 1999).

Sabemos que os sintomas psicóticos, associados à hiperatividade dopaminérgica mesolímbica, são revertidos pelo tratamento com antipsicóticos típicos e que algumas reações adversas desse tratamento são causadas pelo bloqueio de receptores D2 no estriado dorsal. É, portanto, importante estudar como a neurotransmissão dopaminérgica afeta a aprendizagem de respostas condicionadas de esquiva; e estudar os mecanismos sinápticos que promovem a aprendizagem e levam à formação de memórias de procedimento que encontram-se fragilizadas nos pacientes esquizofrênicos.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

O tratamento da esquizofrenia com antipsicóticos típicos está disponível desde a década de 1950 com a indicação da clorpromazina para reduzir os sintomas psicóticos da doença. Entretanto, a relativa incapacidade dessas drogas em tratar os sintomas negativos e cognitivos da esquizofrenia, bem como sua associação ao surgimento de efeitos parkinsonianos significativos, dificulta a adesão dos pacientes ao tratamento. Isso levou a busca por outras opções terapêuticas que culminou no desenvolvimento dos antipsicóticos atípicos em meados da década de 1970. Apesar dos antipsicóticos atípicos oferecerem benefícios em termos de tolerabilidade ao tratamento com melhor prognóstico da doença, o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas, como diabetes, hipercolesterolemia e obesidade, agrava o quadro clínico geral dos pacientes.

A questionável superioridade dos antipsicóticos atípicos frente os típicos torna o tratamento da esquizofrenia um grande desafio até os dias atuais. Nesse sentido, avançar no entendimento da fisiopatologia da doença e nos mecanismos pelos quais os antipsicóticos típicos promovem seus efeitos adversos pode auxiliar no desenvolvimento de drogas com maior efetividade no tratamento da doença.

Nossa primeira hipótese é de que os efeitos amnésicos, associados com a apatia, produzidos pelo tratamento com antipsicóticos típicos são resultantes do bloqueio de receptores D2 no estriado dorsolateral (DLS, do inglês *dorsolateral striatum*). A segunda hipótese é de que o bloqueio de receptores D2 pós-sinápticos, mas não de receptores D2 pré-sinápticos, é importante na produção de tais efeitos. Para investigar a veracidade dessas hipóteses, combinamos a administração sistêmica de doses pré- ou pós-sinápticas de um antagonista dopaminérgico D2 – sulpiride – e infusões intra-DLS de ratos de um agonista D2 – quimpirole. De acordo com nossas previsões, a ativação isolada de receptores D2 no DLS reverterá os efeitos amnésicos causados pela administração da dose pós-sináptica de sulpiride.

A hipótese do segundo experimento apresentado nesta tese é de que antipsicóticos típicos não afetam a dessensibilização dos autoreceptores D2 no NAc, mecanismo implicado na hiperatividade dopaminérgica mesolímbica (Seeman e Seeman, 2014). Nesse experimento, usamos uma das mais modernas técnicas de monitoramento instantâneo da liberação de neurotransmissores *in vivo* para estudar os mecanismos de regulação da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica controlada por receptores D2 pré-sinápticos em camundongos DBA/2J, uma linhagem validada como um modelo animal de esquizofrenia (Young *et al.*, 2009; Colelli *et al.*, 2010). Nossa previsão é de que se sulpiride não afeta a dessensibilização de autoreceptores D2, a liberação de DA no NAc será reduzida pela administração de quimpirole, mas não de sulpiride, após dessensibilização dos autoreceptores D2.

3 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel dos receptores dopaminérgicos D2 pré- e pós-sinápticos do DLS no aprendizado e memória de respostas condicionadas de esquiva e na regulação da neurotransmissão dopaminérgica mesolímbica.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se a administração sistêmica de uma dose pré-sináptica do antagonista D2 pode prejudicar o aprendizado e memória da tarefa de esquiva ativa de duas vias.
- Verificar se a infusão intra-DLS de um agonista D2 é capaz de reverter os efeitos do antagonismo D2 pré-sináptico.
- Verificar se a administração sistêmica de uma dose pós-sináptica do antagonista D2 pode prejudicar o aprendizado e memória da tarefa de esquiva ativa de duas vias.
- Verificar se a infusão intra-DLS de um agonista D2 é capaz de reverter os efeitos de um antagonista D2 pós-sináptico sobre a aprendizagem.
- Padronizar em nosso laboratório o uso da técnica de amperometria de potencial fixo para o estudo da liberação de DA no NAc de animais anestesiados evocada pela estimulação elétrica de fibras dopaminérgicas mesolímbicas.
- Verificar se a microinfusão intra-NAc do agonista dopaminérgico D2 quimpirole é capaz de reverter os efeitos das doses pré-sináptica e pré- e pós-sináptica do antagonista D2 sulpiride sobre a liberação de dopamina no NAc.
- Estudar se esses tratamentos farmacológicos alteram a dessensibilização de receptores D2 pré-sinápticos.

4 METODOLOGIA

4.1 EXPERIMENTO 1

4.1.1 Animais

Setenta ratos Wistar machos adultos provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná pesando entre 280-310 g no início dos experimentos foram utilizados. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luz controladas (ciclo de 12 h, acendimento às 07h) com água e ração *ad libitum*. Todos os esforços necessários para minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento foram tomados durante os procedimentos experimentais. O projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR) com número de protocolo 548. Os procedimentos experimentais adotados estão em congruência com a lei Arouca (11.794/8 – 2008).

4.1.2 Cirurgia para implantação de cânulas

Previamente à cirurgia estereotáxica os animais foram anestesiados com equitesin (1 g de tiopental; 4,25 g de hidrato de cloral; 42,8 ml de propilenoglicol; 11,5 ml de álcool 90%; 45,7 ml de água destilada; e 2,13 g de sulfato de magnésio) administrado por via intraperitoneal (i.p.) em uma concentração de 40mg/kg; receberam ainda sulfato de atropina (0,4mg/kg, i.p.) para suprimir a salivagem, e penicilina G-procaína (20,000 U em 0,1 ml, i.m.) para diminuir o risco de infecção. Após o animal

estar anestesiado foi realizada a tricotomia da região superior da cabeça, seguindo-se então, a anti-sepsia com povidine-iodine (PVPI).

Após o animal estar fixado ao aparelho estereotáxico pelo conduto auditivo, a pele da região dorsal da cabeça foi removida expondo o crânio do animal. O crânio foi perfurado com o auxílio de uma broca dentária, e então, uma cânula guia (23 ga e 10 mm de comprimento) foi introduzida 2 mm acima do DLS de acordo com as coordenadas definidas através do atlas neuroanatômico de ratos de Paxinos e Watson (2005): antero-posterior (AP): 0,0 mm do bregma; latero-lateral (LL): \pm 3,8 mm da linha medial; dorso-ventral (DV): -2,8 mm do crânio. A cânula foi fixada ao crânio com auxílio de parafusos de joalheiro e acrílico dental.

Após a cirurgia de implantação de cânula todos os animais receberam 1 ml de bicarbonato de sódio saturado, para acelerar a eliminação do anestésico, e retornaram às suas caixas-moradia em sala com temperatura controlada para se recuperarem da anestesia.

4.1.3 Drogas e Grupos Experimentais

O antagonista de receptores D2 – sulpiride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em 1ml/kg de salina acidificada (0,9% NaCl, uma gota de HCl 12M) e o agonista de receptores D2 – quimpirole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em salina (0,9% NaCl), infundido intra-DLS na dose de 10 μ g/0,4 μ l/lado. O pH de ambas soluções foi ajustado para 7,4.

Estudos prévios mostraram que sulpiride em baixas doses (1 mg/kg) possui ação preferencial sobre receptores D2 pré-sinápticos, enquanto em altas doses (acima de 25 mg/kg) atua sobre receptores D2 pré- e pós-sinápticos, produzindo efeitos comportamentais importantes (Wadenberg et al., 1990; Crescimanno et al., 1998; Boschen et al., 2011).

Sulpiride foi administrado por via intraperitoneal (i.p.) 20 minutos antes da sessão treino de esquiva ativa de duas vias e o quimpirole foi infundido imediatamente antes da sessão treino. A administração bilateral intra-DLS foi realizada através de um sistema de infusão composto por um par tubos de polietileno e de agulhas 30 ga que se estendiam 2 mm abaixo da ponta das cânulas implantadas. Esse sistema estava conectado a seringas Hamilton de 10 μ l montadas sobre uma bomba micro-infusora (Insight Instrumentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil). As infusões duravam 30 s e as agulhas eram mantidas no local por mais um minuto para permitir a difusão da solução. Animais do grupo controle receberam infusão de 0,4 μ l de solução salina.

Os grupos experimentais receberam os seguintes tratamentos: salina+salina, salina+10 μ g/lado quimpirole, 1mg/kg sulpiride+salina, 1mg/kg sulpiride+10 μ g/lado quimpirole, 25mg/kg sulpiride+salina e 25mg/kg sulpiride+10 μ g/lado quimpirole.

4.1.4 Esquiva Ativa de Duas Vias

Sete dias após os procedimentos cirúrgicos os animais passaram pelas sessões de treino e teste da esquiva ativa de duas vias. A caixa da esquiva ativa de duas vias consiste num aparato de 23X50X23 cm com frente de plexiglass e chão formado por barras paralelas de aço de 5 mm de calibre e afastadas 15 mm umas das outras. Esta caixa é dividida em dois compartimentos de iguais tamanhos através de uma parede com uma porta que permanece aberta durante sessões.

As sessões de treino e teste foram realizadas após intervalo de 24 horas entre uma e outra. Em cada sessão, após 10 minutos (treino) ou 5 minutos (teste) de habituação, 40 pistas luminosas (CS: duração máxima de 20 segundos) foram pareadas com um choque nas patas de 0,4 mA (US: duração máxima de 10 segundos, iniciando 10 segundos após o início do CS) até que o animal cruzasse para o outro compartimento da caixa. A pista luminosa consistiu na ativação de dois bulbos de luz de 30 W posicionados no centro de cada compartimento da caixa. O animal podia desligar

a pista luminosa e evitar o choque ao cruzar para o outro compartimento durante a apresentação da mesma. Se o animal não evitasse o choque, ainda podia fugir do mesmo ao cruzar para o outro compartimento. O tempo entre cada tentativa (cruzamento inter-tentativa, ITC) variou de forma randômica, nem período entre 10 e 50 segundos.

O número de respostas condicionadas de esquiva (CAR), falhas de fuga e ITC, bem como o tempo de reação para o primeiro choque nas patas e o tempo de reação para a última pista luminosa na sessão treino, foram automaticamente registrados pelo equipamento.

O desenho experimental é apresentado abaixo na Figura 2.

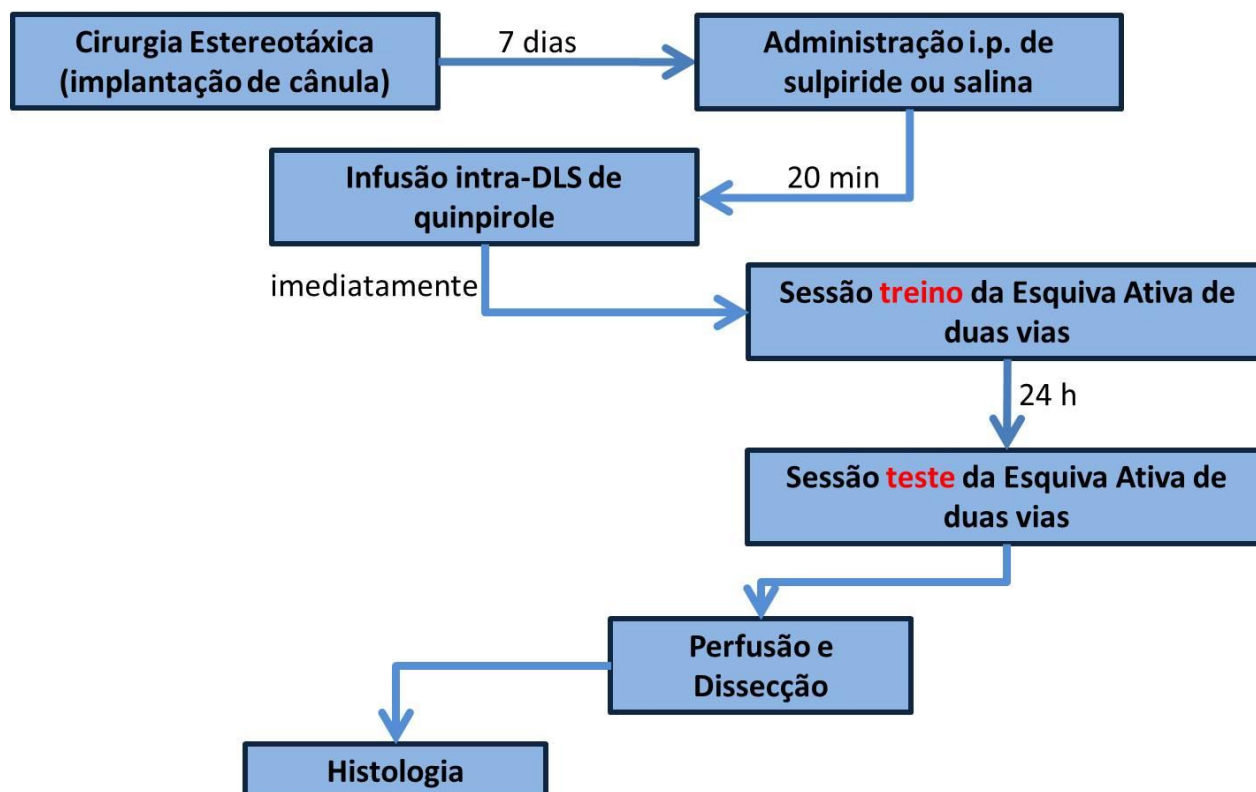


FIGURA 2. Esquema representando o desenho experimental dos procedimentos cirúrgicos, comportamentais e histológicos.

Fonte: o autor.

4.1.5 Histologia

Após finalização dos experimentos comportamentais, os animais foram sacrificados com uma sobredose de pentobarbital (25 mg/ml) e perfundidos transcardiacamente com solução salina e fixados com solução de paraformaldeído 4%. Os cérebros foram removidos do crânio e armazenados na mesma solução fixadora adicionada de sacarose 20% até serem seccionados em fatias de 40 μ m em um micrótomo de lâmina vibratória (Leica, VT1000 S, Bensheim, Alemanha).

O controle histológico do posicionamento das cânulas e dos pontos de infusão foi realizado pelo método de Nissl (Tionina 0,25%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Apenas os animais com infusões limitadas ao DLS foram incluídos nas análises.

4.1.6 Análise Estatística

Os escores de CAR, falhas de fuga e ITC foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas (sessão). Os tempos de reação ao choque nas patas e à pista luminosa foram analisados por ANOVA de uma via. Diferenças entre os grupos foram verificadas pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

4.2 EXPERIMENTO 2

4.2.1 Animais

Dez camundongos machos adultos da linhagem DBA/2J provenientes do biotério do Departamento de Psicologia da Universidade de Memphis (Memphis-TN, EUA), pesando entre 28-36g foram utilizados. Os animais foram mantidos em uma sala com temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade (ciclo de 12h, luzes acesas às 07h) controladas, com água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade de Memphis, em congruência com as diretrizes da Política do Serviço de Saúde Pública sobre Cuidados Humanos e Uso de Animais de Laboratório (*National Institute of Health*, 2002), com as Diretrizes para o Cuidado e Uso de Mamíferos em Neurociência e Pesquisa Comportamental (*National Research Council*, 2003) e a lei Arouca (11.794/8, Outubro de 2008).

4.2.2 Amperometria de Potencial Fixo

A liberação de DA no NAc foi registrada *in vivo* em tempo real (10k de amostras/s) por um sistema de registro eletroquímico (eDAQ, Pty Ltd, CO). Para cada molécula de DA oxidada, dois elétrons são transferidos para o eDAQ que consiste num potenciostato (EA161 Picostat) combinado com um medidor conversor de sinal analógico-digital (A/D) (e-Corder).

Os animais foram anestesiados com uretano (1.5 g/kg, i.p.) e colocados em estereotáxico (David Kopf, CA) montado dentro de uma gaiola de Faraday. A temperatura corporal foi mantida entre $36 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ por uma manta térmica (TC-1000, CWE, NY). O crânio foi exposto e três buracos foram perfurados, dois unilaterais e um contralateral. Um eletrodo de referência Ag/AgCl combinado a um eletrodo auxiliar foi posicionado na superfície do córtex contralateral ao eletrodo estimulador bipolar concêntrico (CBARD75, diâmetro do polo externo 125 μm e diâmetro do polo interno 25 μm , FHC, ME) posicionado no FPM (coordenadas em mm em relação ao bregma: AP - 2.1, ML -1.1, DV -4.8 a partir da dura mater). A fibra de carbono do eletrodo de registro

de DA (250 μm comprimento total X 10 μm de comprimento da fibra exposta) foi posicionada no NAc ipsilateral ao eletrodo estimulador (coordenadas em mm em relação ao bregma: AP +1.2, ML -0.7, DV -3.8 a partir da dura mater) (Franklin and Paxinos, 1997). Após implante dos eletrodos, aguardou-se cerca de 20 minutos para a estabilização dos registros.

4.2.3 Inibição e dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 por estímulo condicionante (EC)

O procedimento para verificar a liberação de DA evocada por estímulo condicionante (EC) utilizando FPA foi validado por Benoit-Marand e colaboradores (2001). Variações na liberação de DA foram determinadas com um par de estímulos teste (T1 e T2: com 10 pulsos de 800 μA a 50Hz com 0,5 ms de duração, separados por um intervalo de 10 s) aplicados no FPM seis vezes a cada 30 s. Quatro sequências de EC (5, 10, 20, 40 pulsos de 800 μA a 15Hz com 0,5 ms de duração cada um) foram aplicados antes de T2 de forma que sempre houvesse um intervalo de 0,3 s entre o fim dos pulsos de EC e o início de T2. T1 acontecia aproximadamente 20 s após o estímulo T2 prévio e era registrado na ausência de qualquer EC, servindo, dessa forma, como uma linha de base móvel.

Os efeitos dos ECs na DA evocada por T2 em relação a T1 foram mensurados em ordem ascendente (ou seja, primeiro foram determinados os efeitos do EC de 5 pulsos, em seguida do EC de 10 pulsos, após do EC de 20 pulsos e então do EC de 40 pulsos). A sequência inteira foi finalizada em aproximadamente 10 minutos.

4.2.4 Materiais e desenho experimental

Sulpiride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi dissolvido em 10 ml/kg com salina acidificada (0,9% NaCl, uma gota de HCl 12M). As doses de sulpiride para camundongos (baixa: 3mg/kg; alta 50mg/kg) foram escolhidas com base na sua relação com as doses utilizadas em ratos em experimentos prévios realizados pelo nosso grupo (Boschen et al., 2011; Boschen et al., 2015) e com as doses utilizadas em outros estudos em camundongos (Gubernator et al., 2009; Centonze et al., 2009; Rodgers et al., 1994). Quimpirole foi dissolvido em salina e infundido intra-NAc na dose de 10 µg/0,2µl, de acordo com Grili et al., 2009.

O desenho experimental é apresentado de forma esquemática na Figura 3. A liberação de DA evocada por T1, EC e T2 sempre foi realizada primeiramente na ausência de qualquer tratamento farmacológico, assim cada animal foi controle de si mesmo. Imediatamente após a finalização da primeira sequência de estímulos, sulpiride (3 ou 50mg/kg) foi administrado por via i.p. e as estimulações foram reiniciadas após 15 minutos. Quimpirole foi infundido intra-NAc por um capilar de sílica imediatamente antes do reinício das estimulações.

Três camundongos receberam apenas infusões intra-NAc de quimpirole; outros três camundongos receberam sulpiride 3mg/kg i.p. e 10 µg de quimpirole intra-NAc; e quatro outros camundongos receberam de sulpiride 50 mg/kg i.p. e 10 µg de quimpirole intra-NAc.

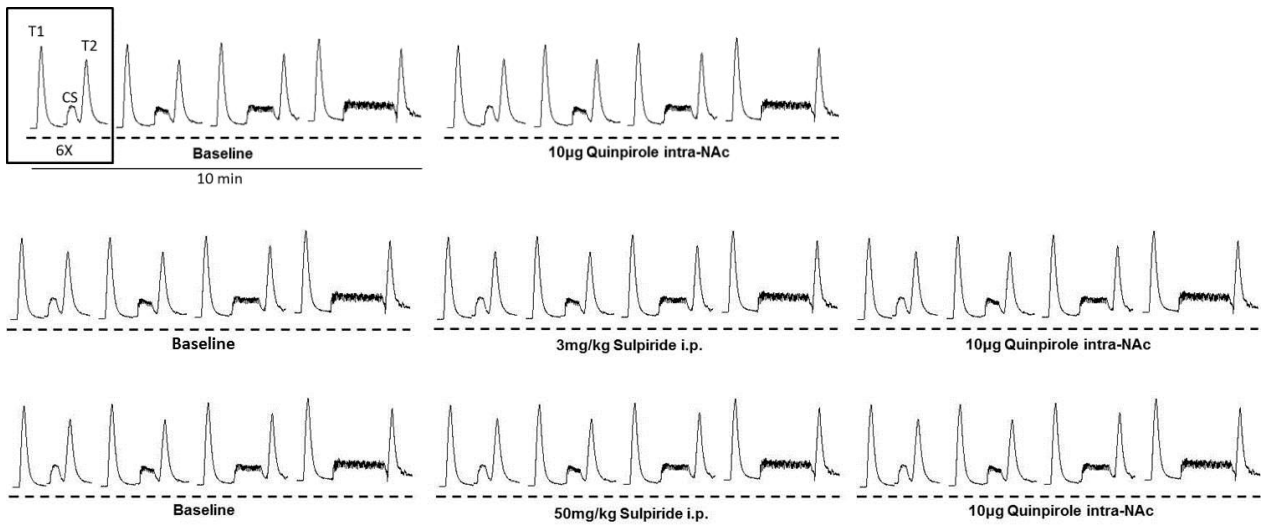


FIGURA 3. Desenho experimental representando picos de DA evocada pelos estímulos T1, T2, EC de 5 pulsos, EC de 10 pulsos, EC de 20 pulsos e EC de 40 pulsos.

FONTE: o autor.

4.2.5 Histologia

Ao final de cada experimento, uma corrente anódica direta (100 μ A por 10 s) foi aplicada ao eletrodo estimulador para produzir uma lesão tecidual local. Os cérebros dos camundongos foram armazenados em solução de formalina 10% adicionada de 0,1% de ferrocianeto de potássio para posterior seccionamento em criostato. O posicionamento dos eletrodos foi determinado pela comparação das secções cerebrais com diagramas coronais do atlas neuroanatômico de Franklin e Paxinos (1997).

4.2.6 Análise Estatística

Os efeitos dos tratamentos na inibição de liberação de DA ou na dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 foram analisados por ANOVA de uma via ou por ANOVA de duas vias com medidas repetidas quando apropriado.

Análises adicionais *post-hoc* de Newman-Keuls foram conduzidas para determinar a natureza dos efeitos significativos considerados quando $p < 0,05$.

5 ARTIGOS CIENTÍFICOS

5.1 ACTIVATION OF POSTSYNAPTIC D2 DOPAMINE RECEPTORS IN THE RAT DORSOLATERAL STRIATUM PREVENTS THE AMNESTIC EFFECT OF SYSTEMICALLY ADMINISTERED NEUROLEPTICS

O primeiro artigo científico a integrar a tese investiga a participação dos receptores D2 pré- e pós-sinápticos do DLS no aprendizado e memória da esquila ativa de duas vias. Este artigo foi aceito para publicação na revista *Behavioural Brain Research*.

Activation of postsynaptic D2 dopamine receptors in the rat dorsolateral striatum prevents the amnesic effect of systemically administered neuroleptics

Suelen Lucio Boschen¹, Roberto Andreatini¹, Claudio da Cunha¹

¹ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81.530-980, PR, Brazil.

Correspondence must be addressed to Dr. Claudio Da Cunha, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil.

Phone: +55 41 3361-1718; Fax: +55 41 3266-2042.

Email: dacunha.claudio@gmail.com

Abstract

Systemically administered antipsychotics bind to dopamine (DA) D2 receptors expressed in both pre- and postsynaptic neurons of different striatal sites and present an amnesic effect on learning and memory of conditioned avoidance responses (CAR). The aim of this study was to test whether blockade of the pre- or post-synaptic D2 receptors of the dorsolateral striatum of rats is the mechanism by which systemically administered antipsychotics present this amnesic effect. CAR learning and memory was evaluated in rats that received i.p. administrations of pre- or postsynaptic doses of the antipsychotic sulpiride combined with intra-DLS infusion of the D2 agonist quinpirole. Intra-DLS quinpirole itself was not amnesic and this effect was prevented by co-administration of presynaptic dose of sulpiride. However, sulpiride was amnesic when administered systemically in a post- but not presynaptic dose. This amnesic effect of sulpiride was prevented by the co-administration of quinpirole into the DLS. These results show that a blockade of postsynaptic D2 receptors in the DLS is necessary and sufficient to produce the amnesic effect of neuroleptics on CARs.

Keywords: two-way active avoidance; basal ganglia; schizophrenia; neuroleptic; action-selection.

1. Introduction

Antipsychotics are largely used in many psychiatric diseases, including schizophrenia, Huntington's disease and bipolar disorder ⁽¹⁻³⁾. At clinical doses, both typical and atypical antipsychotics occupy about 65% of the D2 dopamine (DA) receptors in the striatum, prefrontal cortex and limbic structures ⁽⁴⁾. One of the most prominent effects of D2 receptor antagonists is the impairment over learning and performance of conditioned avoidance responses (CARs). Previous studies suggest that such effect over CAR performance is caused mostly by the occupancy of D2 receptors in the nucleus accumbens (NAc) ⁽⁵⁾ while its effect over CAR learning and memory depends on occupancy of D2 receptors in the dorsolateral striatum (DLS) ^(6,7).

Two subpopulations of striatal medium spiny neurons (MSNs) are proposed to control the mechanisms of action selection ^(8,9). The striatonigral MSNs of the direct pathway, which express D1 receptors, are proposed to select which motor action will be initiated in response to a specific stimulus; and the striatopallidal MSNs of the indirect pathway, which express D2 receptors, are proposed to inhibit concurrent actions ⁽¹⁰⁻¹⁴⁾.

Most evidence that the DLS plays a critical role in stimulus-response (S-R) habit learning (i.e. learning to respond automatically to a specific stimulus) comes from inactivation ^(15,16) and lesion studies ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾. However, because MSNs of the direct and indirect pathways are mosaically distributed through the DLS ^(20,9), lesion studies cannot detangle the roles of each pathway.

In previous studies, we showed that infusion of D1 or D2 antagonists into the rat DLS impairs CAR scores in the test but not in the training session ^(6,7). This suggests that, as in other learning and memory tasks ⁽²¹⁻²³⁾, activation of both D1 and D2 receptors in the DLS is needed for memory consolidation of S-R habits.

D2 receptors are expressed in both pre- and postsynaptic sites of the nigrostriatal pathway ⁽²⁴⁻²⁶⁾. In a previous study we showed that sulpiride impaired CAR memory when infused systemically ⁽⁶⁾. This raises the question: which of these synaptic sites is critical for this effect? In addition, the amnesic effect of the intra-DLS infusion of an antipsychotic, as shown in previous studies, does not rule out the involvement of other brain sites when antipsychotics are administered systemically, as in schizophrenia

treatment. Another question is: is the DLS a critical site for the amnesic effect of antipsychotics? Here we directly addressed these questions by testing whether the effect of the i.p. administration of preferentially pre- or postsynaptic doses of the D2 receptor antagonist sulpiride on CAR learning could be prevented by the co-administration of the D2 agonist quinpirole into the DLS.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Seventy adult male Wistar rats from our own breeding stock, weighing 280-310g at the beginning of the experiments were used. The rats were maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12-h light/dark cycle (lights on, 7:00 a.m.) with water and food available *ad libitum*. All possible efforts were made to minimize number of animals used and their suffering in the experimental procedures. These procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Federal do Parana (protocol number 548) and are consistent with the Brazilian law (11.794/8 October 2008) and the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (National Research Council 2003). The number of rats per group is indicated in the figure legends.

2.2. Surgery

Five to 7 days before behavioral experiments started, rats received atropine sulfate (0.4 mg/kg, i.p.), penicillin G-procaine (20,000U in 0.1 ml, i.m.) and were anesthetized with 3 ml/kg equithesin (1% sodium thiopental, 4.25% chloral hydrate, 2.13% magnesium sulfate, 42.8% propylene glycol, and 3.7% ethanol in water). Stainless-steel guide cannulae (1 cm long, 23 ga.) were bilaterally implanted aiming 2.0 mm above the DLS, according to the following coordinates: DLS: AP 0.0 mm from bregma; ML ± 3.8 mm from midline; DV -2.8 mm from skull surface⁽²⁷⁾. The cannulae

were fixed with polyacrylic cement anchored to the skull with stainless-steel screws. After surgery, rats were allowed to recover from anesthesia in a temperature-controlled chamber and then placed back in their cages. Eight out of 70 rats died.

2.3. Drugs

Sulpiride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 1 ml/kg body weight acidified saline (0.9% NaCl) and quinpirole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 0.4 µl/side saline. The pH was adjusted to 7.4 after the drugs were dissolved. Previous studies showed that the preferentially presynaptic action of 1 mg/kg sulpiride and pre- and postsynaptic action of 25mg/kg sulpiride produce reliable behavioral effects^(5,6,28), along with a high dose of quinpirole (10µg/0.4 µl/side). Sulpiride was administered i.p. 20 min before training and quinpirole was administered immediately before training bilaterally into the DLS through a pair of 30-ga. needles extending 2 mm beyond the tips of the implanted guide cannulae. The needles were connected to a 10 µl Hamilton syringe mounted on a microinfusion pump (Insight Instruments, Ribeirao Preto, Brazil) by polyethylene tubings. Infusions were made over 30 s and needles remained in place for an additional minute. Control animals received saline instead of drug solution.

2.4. Two-way active avoidance

The test apparatus was an automated 23 x 50 x 23 cm shuttle-box (Insight Instruments, Ribeirao Preto, Brazil) with Plexiglas front and top panels and a floor of parallel 5 mm caliber stainless-steel bars 15 mm apart. The box was equally divided in 2 compartments by a wall with a door; the door remained open during the tests. Two 30 W light bulbs were centered on the rear wall of each compartment. Training and test sessions were carried out 24 h apart. Each session started with habituation to the box: 10 min for the training and 5 min for the test session. Forty pairs of light cue and footshock were presented at random intervals ranging from 10 to 50 s. Each light cue

(conditioned stimulus, CS) had a maximum duration of 20 s and each 0,4 mA footshock (unconditioned stimulus, US) started 10 s after the CS onset with a maximum duration of 10 s. Both the footshock and the light cue could be turned off if the animal crossed to the other compartment. Footshock could be avoided if the animal crossed during the 10 s of the light presentation. The following scores were automatically recorded: (i) CAR - when the animal crossed in response to the CS before the US onset; (ii) escape failure - when the animal did not respond to both CS and US; (iii) inter-trial crossing (ITC) - if the animal crossed when neither the CS nor the US were presented; (iv) reaction time to the footshock - latency of the first escape from the footshock in the training session; (v) reaction time to the light cue - latency of the last CAR in the training session.

2.5. Histology

At the end of the experimental procedures, all rats were killed with an overdose of pentobarbital. To check for guide cannulae and infusion needles placements, rats were transcardially perfused with saline solution, followed by 4% paraformaldehyde. Brains were post-fixed in the same fixative containing additional 20% sucrose before sectioning. Coronal 40 μm thick sections were made with a vibrating-blade microtome (Leica, VT1000 S, Bensheim, Germany) and processed for thionin staining. Only animals with infusions limited to the DLS were included in the present analysis.

2.6. Statistical analyses

CAR, escape failure, and ITC scores were analyzed by two-way ANOVA with repeated measures (session) separately for the following treatments: saline+saline, saline+10 $\mu\text{g}/\text{side}$ quinpirole, 1 mg/kg sulpiride+saline, 1 mg/kg sulpiride+10 $\mu\text{g}/\text{side}$ quinpirole; and for saline+saline, saline+10 $\mu\text{g}/\text{side}$ quinpirole, 25 mg/kg sulpiride+saline, 25 mg/kg sulpiride+10 $\mu\text{g}/\text{side}$ quinpirole. Two-way ANOVA with repeated measures (session) of all 6 treatments was also conducted and results were equivalent. Footshock and light-cue reaction times were analyzed by one-way ANOVA. Differences

among groups were analyzed by Newman-Keuls post-hoc test. Differences were considered to be statistically significant when $p < 0.05$. Figures were designed using GraphPad Software.

3. Results

3.1. Postsynaptic effects

Fig. 1A shows that the systemic preferentially postsynaptic dose of sulpiride impaired CAR learning from training to test session; such impairment was reversed by intra-DLS infusion of 10 $\mu\text{g}/\text{side}$ quinpirole. Quinpirole alone did not affect CAR learning and memory, although it affected CAR scores in the test session. Two-way ANOVA showed significant treatment effect [$F(3,35) = 3.42$; $p < 0.05$] and session effect [$F(1,35) = 33.18$; $p < 0.05$]; but a non-significant treatment X session interaction [$F(3,35) = 0.52$; $p = 0.67$]. ANOVA of the escape-failure scores showed a significant treatment X session interaction [$F(3,35) = 5.68$; $p < 0.05$] but no significant treatment [$F(3,35) = 2.81$; $p = 0.05$] and session effects [$F(1,35) = 3.63$; $p = 0.06$]. Intra-DLS infusion of quinpirole increased escape-failure scores in the training session (Fig. 1B). However, these scores were normalized in the test session which is when CAR scores were impaired. ANOVA of the ITC scores showed significant treatment effect [$F(3,35) = 3.03$; $p < 0.05$] and treatment X session interaction [$F(3,35) = 3.89$; $p < 0.05$] but a non-significant session effect [$F(1,35) = 2.86$; $p = 0.10$]. Newman-Keuls post-hoc test for ITC scores did not show significant differences among groups (Fig. 1C).

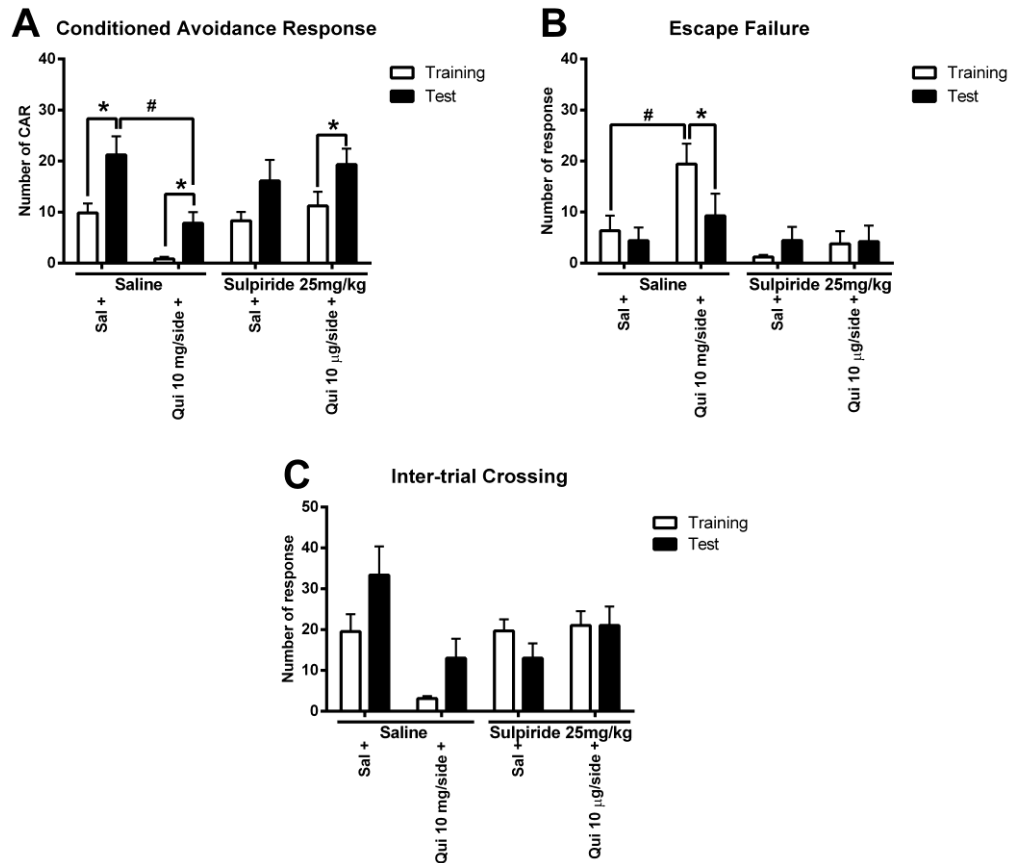


Fig. 1 Preferentially postsynaptic effects of quinpirole and sulpiride on 2-way active avoidance learning and memory. Rats treated with saline or a pre- and postsynaptic dose of sulpiride (25 mg/kg, i.p., 20 min pre-training) received saline or quinpirole (Qui 10 μ g/side, intra-DLS immediately before training). Effects of the drug treatments were analyzed on scores of conditioned avoidance responses (A), escape failures (B) and inter-trial crossings (C). Data are expressed as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ compared to the same group in the training session; # $p < 0.05$ compared to saline in the respective session (Newman-Keuls after ANOVA). N = 7-14 rats per group.

3.2. Presynaptic effects

Fig. 2A shows the effects of intra-DLS quinpirole infusion in rats treated with a systemic presynaptic dose of sulpiride. Two-way ANOVA showed significant drug treatment [$F(3,32) = 3.31$; $p < 0.05$] and session effect [$F(1,32) = 32.14$; $p < 0.05$], and significant treatment X session interaction [$F(3,32) = 3.10$; $p < 0.05$]. Intra-DLS

quinpirole and sulpiride treatments themselves did not significantly affect CAR learning and memory. However, sulpiride-treated animals that received intra-DLS postsynaptic dose of quinpirole scored less in the test session but not in the training session. A significant effect on escape-failure scores was observed for session [$F(1,32) = 13.12$; $p < 0.05$] but not for drug treatment [$F(3,32) = 1.88$; $p = 0.15$] and for treatment \times session interaction [$F(3,32) = 1.92$; $p = 0.15$]. Intra-DLS quinpirole decreased escape-failure scores in the test session (Fig. 2B). Significant effects on ITC scores were observed for session [$F(1,32) = 6.90$; $p < 0.05$] and for drug treatment [$F(3,32) = 3.27$; $p < 0.05$] but not for treatment \times session interaction [$F(3,32) = 1.17$; $p = 0.34$]. Significantly increased ITC scores were observed in the test compared to training session for the control sal+sal group. Such increase was reversed by 10 μ g/side quinpirole and by 1 mg/kg sulpiride both for the intra-DLS saline and quinpirole groups (Fig. 2C).

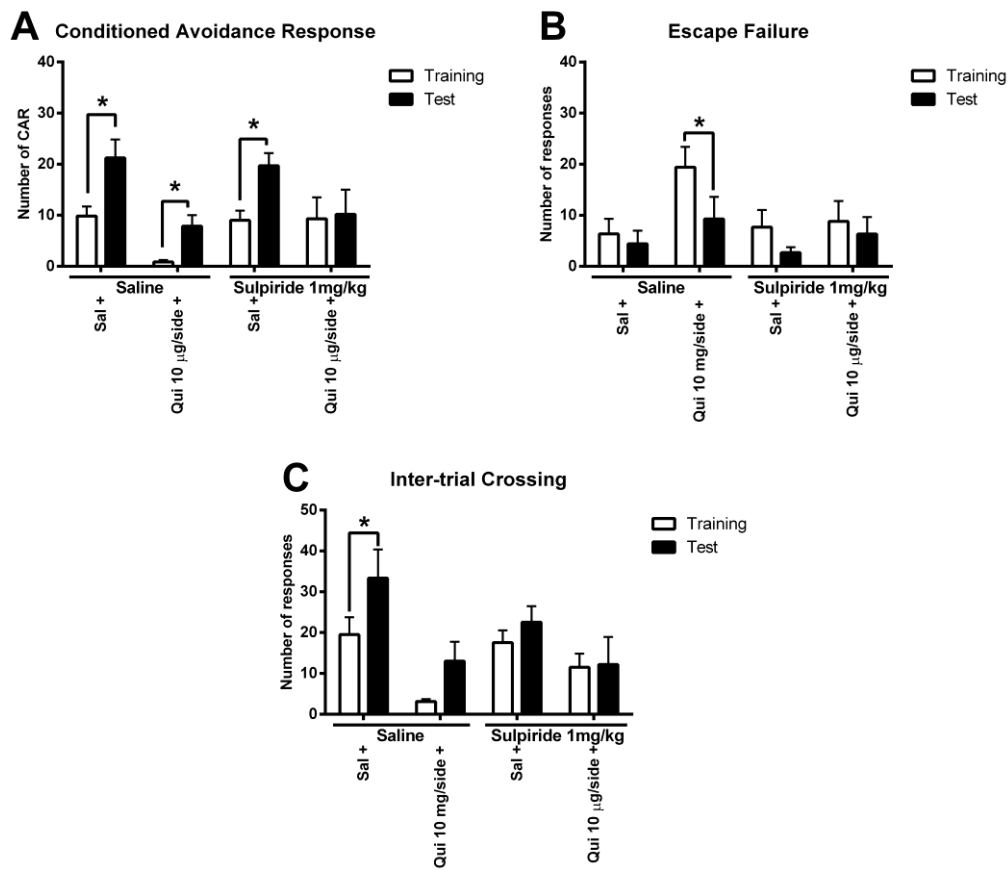


Fig. 2 Presynaptic effects of sulpiride and quinpirole on 2-way active avoidance learning and memory. Rats treated with saline or a presynaptic dose sulpiride (1 mg/kg, i.p., 20 min pre-training) received saline

or quinpirole (Qui, 10 µg/side, intra-DLS immediately before training). Effects of the drug treatments were analyzed on scores of conditioned avoidance responses (A), escape failures (B) and inter-trial crossings (C). Data are expressed as mean ± SEM; * $p < 0.05$ compared to the same group on training session (Newman-Keuls after ANOVA). N = 6-14 rats per group.

3.3. Light-cue- and footshock-reaction times

Table 1 shows the latencies to respond to the CS and to the US for the different treatments. One-way ANOVA of the light-cue data showed no significant difference in the latencies when the rats start to respond to the last light cue [$F(5,48) = 1.49$; $p = 0.21$], but a significant effect to respond to the first footshock in the training session [$F(5,48) = 4.45$; $p < 0.05$]. Intra-DLS quinpirole increased the latency to respond to the first footshock in comparison with all treatments.

Table 1 Effects of sulpiride and quinpirole on footshock and light-cue reaction times.

Treatment	Reaction time (s)	
	Light-cue (CS)	Footshock (US)
Saline + Saline	6.13 ± 0.88	1.89 ± 0.32
Saline + Quinpirole	8.20 ± 0.76	6.24 ± 1.62 +
Sulpiride 1mg/kg + Saline	5.12 ± 0.93	2.18 ± 1.01
Sulpiride 25mg/kg + Saline	5.52 ± 0.93	1.22 ± 0.25
Sulpiride 1mg/kg + Quinpirole	4.05 ± 1.40	2.31 ± 0.33
Sulpiride 25mg/kg + Quinpirole	5.04 ± 1.16	1,78 ± 0.88

Latencies to cross in response to the first footshock and to the last light cue in the training session are expressed as mean ± SEM. Rats treated with saline or sulpiride (1 or 25 mg/kg, i.p., 20 min pre-training) received saline or quinpirole (Qui 10 µg/side, intra-DLS immediately before training). + $p < 0.05$ compared to all groups (Newman-Keuls after one-way ANOVA). N = 6-14 rats per group.

3.4. Localization of infusions

The brain sections were examined under a light microscope and the location of needle tips was determined using the atlas plates of Paxinos and Watson (2005)⁽²⁷⁾.

Data of 8 animals with wrong cannulae placement were excluded. Three rats had quipirole infusion positioned dorsally to dorsolateral striatum. To ensure that behavioral effects are specific to the DLS, data of these animals were analyzed separately with the intra-DLS control groups saline / saline and saline / 10 µg/side quipirole and are shown in the supplemental material.

Fifty four animals had correct cannulae placements. After the exclusions, the number of animals per group was: saline / saline, N=14; saline / 10 µg/side quipirole, N=7; 1 mg/kg sulpiride / saline group, N=9; 1 mg/kg sulpiride / 10 µg/side quipirole, N=6; 25 mg/kg sulpiride / saline, N=9; 25 mg/kg sulpiride / 10 µg/side quipirole group, N=9. Tips of the infusion needles were localized in the dorsolateral striatum, ranging in the AP plane from 0.48 mm to -0.26 mm from bregma, from 3 mm lateral to midline to the corpus calosus in both hemispheres (ML) and from the corpus calosus to - 4.4 mm below dura in the DV plane (Fig. 3).

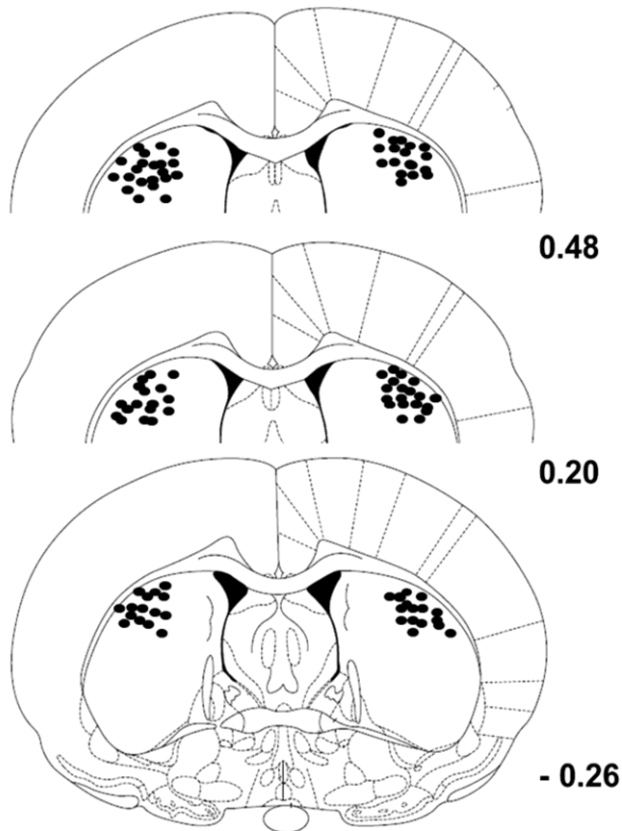


Fig. 3 Position of the injection sites in the rat DLS. Schematic drawing of coronal sections shows the locations of quinpirole infusions, according to the Paxinos and Watson Atlas (2005)⁽²⁷⁾. The approximate distances (mm) from the bregma are indicated.

4. Discussion

The present study aimed to address two important questions. The first is whether the DLS is a critical site for the amnesic effect of neuroleptics on CARs. Our results suggest that indeed it is. Systemic administration of a high pre- and postsynaptic dose of the D2 antagonist sulpiride (25mg/kg) impaired CAR learning and memory, and this effect was prevented by the co-administration of the D2 agonist quinpirole into the DLS. Therefore, removal of the blockade of D2 receptors in the DLS was sufficient to block the amnesic effect of the neuroleptic sulpiride.

The second important question was whether such amnesic effect is mediated by pre- or postsynaptic D2 receptors. It has been shown that relatively larger doses of drugs are needed to affect postsynaptic compared with presynaptic D2 receptors ⁽²⁹⁻³¹⁾. Systemic administration of sulpiride *per se* was amnesic in a pre- and postsynaptic dose (25 mg/kg) but not in a preferentially presynaptic dose (1.0 mg/kg). Coherently, co-administration of presynaptic dose of sulpiride and intra-DLS quinpirole reduced CAR scores in the test session, impairing CAR learning and memory. This suggests that the amnesic effect was not caused by the blockade of presynaptic D2 receptors. Therefore, we can conclude that the amnesic effect of neuroleptics on CARs is mediated by the postsynaptic D2 receptors of the DLS.

Reduction of CAR scores shown for pre and postsynaptic sulpiride treatments does not appear to be caused by a motor impairment. Although reduction in movements is commonly observed with D2 antagonists ^(6,31-33), this did not happen with the doses used in the present study since no significant difference in escape failure and ITC scores was observed. However, intra-DLS quinpirole affected escape failure scores and reaction time to the footshock. This effect was prevented by both doses of sulpiride.

The critical role of DLS DA on CAR learning and memory has also been supported by other studies using different approaches, including lesion of the rat substantia nigra pars compacta (SNc) ^(19,34-35) and infusion of dopaminergic drugs into the DLS ^(6,7). In this and previous studies, in spite of administering sulpiride and quinpirole before the training session, CAR reduction was seen only in the test session carried out 24 hours later. This suggests that the modulation of D2 receptors in the DLS is involved in S-R habits which are acquired slowly, as shown in previous experiments ^(6,7). It has been shown that S-R habits depend on strengthening the synaptic connections between the somatosensory cortex and the DLS ^(16,36-38).

The present results are summarized in Table 2. It is interesting to note that strong inhibition of the indirect pathway was amnesic and, although strong activation of such pathway was not amnesic, it minimized CAR expression. This suggests that a fine-tuned balance in the activation of the indirect pathway is necessary for CAR learning and/or memory. This agrees with the proposal that not only activation of the direct

pathway but also of the indirect pathway is necessary for action selection ⁽³⁹⁻⁴⁵⁾. Such hypothesis is also supported by others studies implicating striatal DA imbalance in action-selection impairment ^(for a review see 9,46-47). Indirect pathway imbalance is also present in many basal ganglia diseases that cause cognitive impairment ^(48,49), such as schizophrenia and Parkinson's disease. Hypoactivation of the indirect pathway in schizophrenia is a consequence of upregulation of D2 receptors in the dorsal striatum and higher levels of DA in the ventral striatum ⁽⁵⁰⁾. Hyperactivation of the indirect pathway in Parkinson's disease occurs due to progressive loss of nigrostriatal neurons ⁽⁵¹⁻⁵³⁾.

Table 2. Expected actions of the drug treatments on indirect pathway and observed effects on CAR.

Treatment	Presynaptic effect	Postsynaptic effect	Indirect pathway activity	CAR scores
1mg/kg Sulpiride	↑ DA	+	No effect ^(a)	No effect
25mg/kg Sulpiride	↑ DA	--	↑↑	↓
10µg/side Quinpirole	↓ DA	++	↓↓	↓
1mg/kg Sulpiride + 10µg/side Quinpirole	↑ DA } ↓ DA } 0	+ } ++ } +++	↓↓↓	↓
25mg/kg Sulpiride + 10µg/side Quinpirole	↑ DA } ↓ DA } 0	-- } ++ } 0	0	No effect

The effect of the treatments on the indirect pathway was deduced from their effects on dopamine (DA) release (presynaptic effect) added to their effects on activation and/or blockade of postsynaptic D2 receptors. ^(a) The release of DA by the presynaptic dose of sulpiride (1 mg/kg) probably did not affect the indirect pathway because of the higher affinity of DA for the D2 receptors ⁽⁵⁴⁾.

5. Conclusion

In summary, the present study presents evidence that the impairing effect of systemically administered antipsychotics is mediated by blockade of postsynaptic D2 receptors of the indirect pathway in the DLS.

Acknowledgements: The authors are grateful for the technical assistance by Sílvia N. Cordazo and Giseli Oliveira, English revision by Alice Burns, and financial support from CNPq, Fundação Araucária, and CAPES. All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the Universidade Federal do Parana (protocol number 548) and are consistent with the Brazilian law (11.794/8 October 2008).

Conflict of Interest: the authors have no conflict of interest to report.

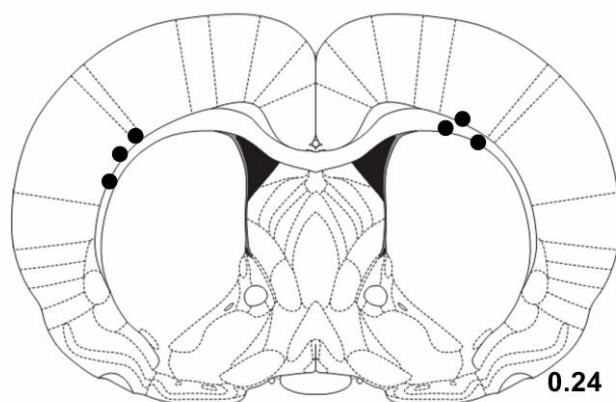
6. References

1. Videnovic A (2013) Treatment of huntington disease. *Curr Treat Options Neurol* 4:424-38. doi: 10.1007/s11940-013-0219-8.
2. Gerhard T, Akincigil A, Correll CU, Foglio NJ, Crystal S, Olfson M (2014) National trends in second-generation antipsychotic augmentation for nonpsychotic depression. *J Clin Psychiatry* 75(5): 490-7. doi: 10.4088/JCP.13m08675.
3. Álamo C, López-Muñoz F, García-García P (2014) The effectiveness of lurasidone as an adjunct to lithium or divalproex in the treatment of bipolar disorder. *Expert Rev Neurother* 14(6):593-605. doi: 10.1586/14737175.2014.915741.
4. Seeman P (2002) Atypical antipsychotics: Mechanism of action. *Can J Psychiatry* 47:27-38. doi: 11873706
5. Wadenberg ML, Ericson E, Magnusson O, Ahlenius S (1990) Suppression of conditioned avoidance-behavior by the local application of (-)-sulpiride into the ventral, but not the dorsal, striatum of the rat. *Biol Psychiatry* 28:297-307. doi: 10.1016/0006-3223(90)90657-N
6. Boschen SL, Wietzikoski EC, Winn P, Da Cunha C (2011) The role of nucleus accumbens and dorsolateral D2 receptors in active avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 96:254-262. doi: 10.1016/j.nlm.2011.05.002
7. Wietzikoski EC, Boschen SL, Miyoshi E et al (2012) Roles of D1-like dopamine receptors in the nucleus accumbens and dorsolateral striatum in conditioned avoidance responses. *Psychopharmacology* 219:159-169. doi: 10.1007/s00213-011-2384-3
8. Redgrave P, Prescott TJ, Gurney K (1999) The basal ganglia: a vertebrate solution to the selection problem? *Neuroscience* 89(4):1009–1023. doi: 10.1016/S0306-4522(98)00319-4
9. Da Cunha C, Wietzikoski EC, Dombrowski P et al (2009) Learning processing in the basal ganglia: A mosaic of broken mirrors. *Behav Brain Res* 199:156–169. doi:10.1016/j.bbr.2008.10.001
10. Albin RL, Young AB, Penney JB (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci* 12(10): 366–375. doi: 10.1016/0166-2236(89)90074-X
11. Bolam JP, Haley JJ, Booth PAC, Bevan MD (2000) Synaptic organization of the basal ganglia. *J Anat* 196(4):527-542. doi: 10.1046/j.1469-7580.2000.19640527.x
12. Surmeier DJ, Ding J, Day M, Wang Z, Shen W (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends Neurosci* 30(5):228-235. doi:10.1016/j.tins.2007.03.008
13. Lovinger DM (2010) Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology* 58(7):951-961. doi:10.1016/j.neuropharm.2010.01.008
14. Redgrave P, Rodriguez M, Smith Y et al (2011) Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 11(11):760-772. doi: 10.1038/nrn2915

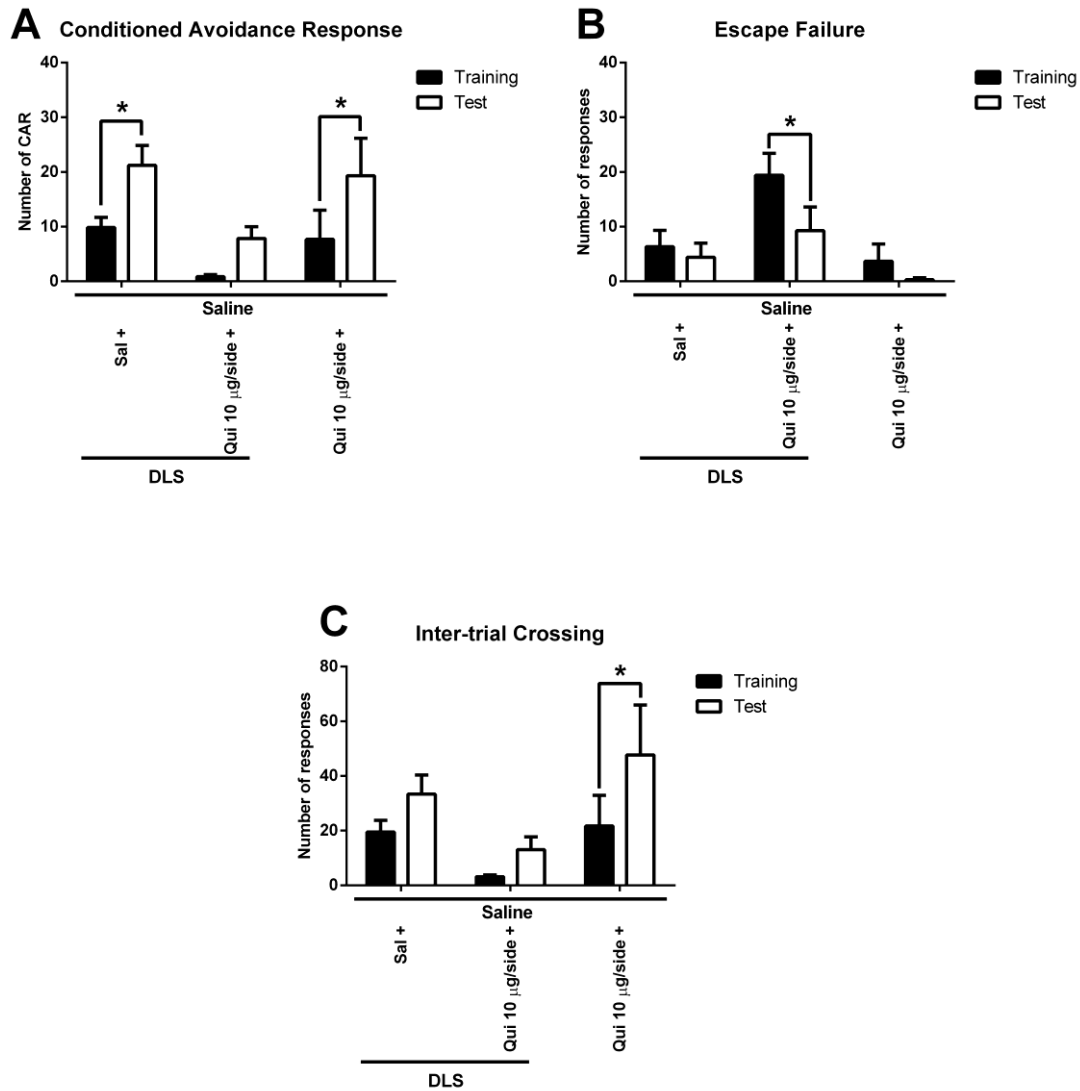
15. Packard MG, McGaugh JL (1996) Inactivation of hippocampus or caudate nucleus with lidocaine differentially affects expression of place and response learning. *Neurobiol Learn Mem* 65:65-72. doi: 10.1006/nlme.1996.0007
16. Yin HH, Knowlton BJ, Balleine BW (2006) Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. *Behav Brain Res* 166(2):189-196. doi: 10.1016/j.bbr.2005.07.012
17. Devan BD, McDonald RJ, White NM (1999) Effects of medial and lateral caudate-putamen lesion on place- and cue-guided behaviors in the water maze: relation to thigmotaxis. *Behav Brain Res* 100:5-14. doi: 10.1016/S0166-4328(98)00107-7
18. Featherstone RE, McDonald RJ (2004) Dorsal striatum and stimulus-response learning: lesions of the dorsolateral, but not dorsomedial, striatum impair acquisition of a stimulus-response-based instrumental discrimination task, while sparing conditioned place preference learning. *Neuroscience* 124(1):23-31. doi: 10.1016/j.neuroscience.2003.10.038
19. Wendler E, Gaspar JCC, Ferreira TL et al (2014) The roles of nucleus accumbens core, dorsomedial striatum and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. *Neurobiol Learn Mem* 109:27-36. doi: 10.1016/j.nlm.2013.11.009
20. Flaherty AW, Graybiel AM (1994) Input-output organization of the sensorimotor striatum in the squirrel monkey. *J Neurosci* 13:1120-1137. doi: 0270-6474/94/140599
21. Sigala S, Missale C, Spano PF (1997) Opposite effects of dopamine D₂ and D₃ receptors on learning and memory in the rat. *Eur J Pharmacol* 336:107-112. doi: 10.1016/S0014-2999(97)01235-1
22. Wiluhn I, Steiner H (2009) Skill-memory consolidation in the striatum: critical for late but not early long-term memory and stabilized by cocaine. *Behav Brain Res* 199(1):103-107. doi: 10.1016/j.bbr.2008.07.010
23. Quinlan MG, Almey A, Caissie M, LaChappelle I, Radiotis G, Brake W G (2013) Estradiol and striatal dopamine receptor antagonism influence memory system bias in the female rat. *Neurobiol Learn Mem* 106:221-229. doi: 10.1016/j.nlm.2013.08.018.
24. Hooper KC, Banks DA, Stordahl LJ, White IM, Rebec GV (1997) Quinpirole inhibits striatal and excites pallidal neurons in freely moving rats. *Neurosci Lett*, 237:69-72. doi: 10.1016/S0304-3940(97)00812-4
25. Missale C, Nash SR, Robinson SW, Jaber M, Caron MG (1998) Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev* 78(1):189-225. doi: 0031-9333/98
26. Centonze D, Gubellini P, Usiello A et al (2004) Differential contribution of dopamine D_{2S} and D_{2L} receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience* 129:157-166. doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.07.043
27. Paxinos G, Watson C (2005) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.
28. Crescimanno G, Emmi A, Amato G (1998) Effects of intraaccumbens microinjections of quinpirole on head turning and circling movement in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 60(4):829-834. doi: 10.1016/S0091-3057(98)00033-1
29. Fusa K, Saigusa T, Koshikawa N, Cools AR (2002) Tyrosine-induced release of dopamine is under inhibitory control of presynaptic dopamine D₂ and, probably, D₃

- receptors in the dorsal striatum, but not in the nucleus accumbens. *Eur J Pharmacol* 448:143–150. doi: 10.1016/S0014-2999(02)01911-8
30. Perreault ML, Graham D, Bisnaire L, Simms J, Hayton S, Szechtman H (2006) Kappa-Opioid Agonist U69593 Potentiates Locomotor Sensitization to the D2/D3 Agonist Quinpirole: Pre- and Postsynaptic Mechanisms. *Neuropsychopharmacol* 31:1967–1981. doi:10.1038/sj.npp.1300938
 31. Dias FRC, Carey RJ, Carrera MP (2009) Apomorphine-induced context-specific behavioural sensitization is prevented by the D1 antagonist SCH 23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the D2 antagonist sulpiride. *Psychopharmacology* 209:137-151. doi: 10.1007/s00213-009-1768-0
 32. Wadenberg MLG, Kapur S, Soliman A, Jones C, Vaccarino F (2000). Dopamine d-2 receptor occupancy predicts catalepsy and the suppression of conditioned avoidance response behavior in rats. *Psychopharmacology* 150:422-429. doi: 10.1007/s002130000466
 33. Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC (2012) Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nat Neurosci* 15(6):816-9. doi:10.1038/nn.3100
 34. Da Cunha C, Gevaerd MS, Vital M et al (2001) Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res* 124:9-18. doi: 10.1016/S0166-4328(01)00211-X
 35. Dombrowski PA, Maia TV, Boschen SL et al (2012) Evidence that conditioned avoidance responses are reinforced by positive prediction errors signaled by tonic striatal dopamine. *Behav Brain Res* 241:112-119. doi: 10.1016/j.bbr.2012.06.031
 36. Ramanathan S, Hanley JJ, Deniau JM, Bolam JP (2002) Synaptic convergence of motor and somatosensory cortical afferents onto GABAergic interneurons in the rat striatum. *J Neurosci* 22(18):8158-69. doi: 0270-6474/02/228158
 37. Alloway KD, Lou L, Nwabueze-Ogbo F, Chakrabarti S (2006) Topography of cortical projections to the dorsolateral neostriatum in rats: multiple overlapping sensorimotor pathways. *J Comp Neurol* 499:33–48. doi: 10.1002/cne.21039
 38. Balleine BW, Liljeholm M, Ostlund SB (2009) The integrative function of the basal ganglia in instrumental conditioning. *Behav Brain Res* 199:43-52. doi:10.1016/j.bbr.2008.10.034
 39. Mink JW (2003) The basal ganglia and involuntary movements: impaired inhibition of competing motor patterns. *Arch Neurol* 60:1365–68. doi: 10.1001/archneur.60.10.1365.
 40. Nambu A (2008) Somatotopic organization of the primate basal ganglia. *Front Neuroanat* 5:1-9. doi: 10.3389/fnana.2011.00026
 41. Kravitz AV, Freeze BS, Parker PRL et al (2010) Regulation of parkinsonian motor behaviours by optogenetic control of basal ganglia circuitry. *Nature*, 466:622–626. doi: 10.1038/nature09159
 42. Aceves JJ, Rueda-Orozco PE, Hernandez-Martinez R, Galarraga E,argas J (2011) Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: A switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. *Learn Memory* 18:764-773. doi: 10.1101/lm.023432.111
 43. Cui G, Jun SB, Jin X et al (2013) Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. *Nature* 494:238–242. doi:10.1038/nature11846

44. Surmeier DJ (2013) Neuroscience: to go or not to go. *Nature* 494(7436):178-9. doi: 10.1038/nature11856.
45. Ilango A, Kesner AJ, Keller KL, Stuber GD, Bonci A, Ikemoto S (2014) Similar roles of substantia nigra and ventral tegmental dopamine neurons in reward and aversion. *J Neurosci* 34(3):817-22. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1703-13.2014.
46. Nicola SM (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology* 191:521–550. doi: 10.1007/s00213-006-0510-4.
47. Keeler JF, Pretsell DO, Robbins TW (2014) Functional implications of dopamine D1 vs D2 receptors: A ‘Prepare and Select’ model of the striatal direct vs. indirect pathways. *Neuroscience*, 14:00584-3. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.07.021
48. Turner RS, Desmurget M (2010) Basal ganglia contributions to motor control: a vigorous tutor. *Curr Opin Neurobiol* 20(6):704-16. doi: 10.1016/j.conb.2010.08.022.
49. Gerfen CR, Surmeier DJ (2011) Modulation of Striatal Projection Systems by Dopamine. *Annu Rev Neurosci* 34:441–66. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113641
50. Simpson EH, Kellendonk C, Kandel E (2010) A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. *Neuron* 65:585-596. doi: 10.1016/j.neuron.2010.02.014.
51. Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC et al (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250(4986):1429–32. doi:10.1126/science.2147780
52. DeLong MR, Wichmann T (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Arch Neurol* 64(1):20-24. doi:10.1001/archneur.64.1.20.
53. Gittis AH, Hang GB, LaDow ES et al (2011) Rapid target-specific remodeling of fast-spiking inhibitory circuits after loss of dopamine. *Neuron*, 71:858–868. doi: 10.1016/j.neuron.2011.06.035
54. Dreyer JK, Herrik KF, Berg RW, Hounsgaard JD (2010) Influence of phasic and tonic dopamine release on receptor activation. *J Neurosci* 30:14273–14283. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1894-10.2010



Supplemental Fig.1 Position of injection sites out of the dorsolateral striatum of three rats treated with saline and 10 μ g/side quinpirole. The approximate distance (mm) from the bregma is indicated. Adapted from the atlas of Paxinos and Watson (2005)⁽²⁷⁾.



Supplemental Fig. 2 Effects of intra-dorsolateral striatum infusion with saline and quinpirole and out of intra-dorsolateral quinpirole on 2-way active avoidance learning and memory. Effects of the drug treatments in and out of the dorsolateral striatum were analyzed on scores of conditioned avoidance responses (CAR) (A), escape failures (B) and inter-trial crossings (C). Data are expressed as mean \pm SEM; * $p < 0.05$ compared to the same group on training session (Newman-Keuls after ANOVA). N = 3-14 rats per group.

Supplemental Table 1 Two-way ANOVA statistics of the 2-way active scores for rats treated with saline, intra-DLS 10 μ g quinpirole and out of intra-DLS 10 μ g quinpirole.

	Treatment		Session		Interaction	
	F [df = 2,21]	<i>p</i>	F [df = 1,21]	<i>p</i>	F [df = 2,21]	<i>p</i>
CAR	3.95	0.035	31.72	0.000	0.93	0.409
Escape failure	2.66	0.093	8.92	0.007	3.29	0.057
Inter-trial crossing	3.52	0.048	14.28	0.001	0.87	0.433

See supplemental Fig.2 for post-hoc tests.

5.2 ACTIVATION DOES NOT DESENSITIZE D2 AUTORECEPTORS

O segundo artigo científico a integrar a tese investiga a regulação de autoreceptores D2 no NAc de camundongos DBA/2J, modelo animal de esquizofrenia, através da estimulação elétrica de fibras dopaminérgicas do feixe prosencefálico medial (FPM) pela técnica de amperometria de potencial fixo. Este artigo será submetido para avaliação à revista *Journal of Neurochemistry*.

Title: Activation of D2 dopamine autoreceptors in the NAc does not affect desensitization

Suelen Lucio Boschen^{1,2}, Savannah Marie Trabosh², Eric McKimm², Roberto Andreatini¹, Charles D. Blaha², Claudio Da Cunha^{1*}

¹ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81.530-980, PR, Brazil.

² Department of Psychology, University of Memphis, Memphis, Tennessee, 38152 - USA

* Correspondence must be addressed to Dr. Claudio Da Cunha, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, 81531-980 Curitiba, Paraná, Brazil. Phone: +55 41 3361-1718; Fax: +55 41 3266-2042.

Email: dacunha.claudio@gmail.com

Running title: Activation does not desensitize D2 autoreceptors

Keywords: D2 receptors, presynaptic receptors, fixed potential amperometry, schizophrenia

Abbreviations:

CS – conditioning stimuli

DARs - Dopamine receptors

DIR – Dopamine inhibition reversal

D2Rs – D2 receptors

FPA – Fixed potential amperometry

MFB – Medial forebrain bundle

NAc – Nucleus accumbens

Sulp – Sulpiride

Qui – Quinpirole

Abstract

Impaired mesolimbic D2 autoreceptors desensitization is implicated in the etiology of schizophrenia. Fixed potential amperometry was used to electrically evoke dopamine (DA) release in a schizophrenia animal model of DBA/2J mice. Inhibition of DA release and short-term desensitization of D2 autoreceptors was investigated by applying a pair of test stimuli (T1 and T2, 10 pulses of 800 μ A at 50 Hz) in the medial forebrain bundle (MFB) 10s apart to evoke DA efflux. Four sets of conditioning stimuli (CS; 5, 10, 20 and 40 pulses; 0.5ms pulse duration at 15Hz) were given 0.3s before T2 onset. Low (3 mg/kg, i.p.) and high (50 mg/kg, i.p.) doses of the typical antipsychotic sulpiride blocked DA release inhibition in the nucleus accumbens. The D2 receptor agonist quinpirole (10 μ g, intra-NAc) did not affect DA release inhibition *per se*, but reverted the increase in extracellular DA induced by sulpiride. On the other hand, D2 autoreceptor short-term desensitization induced by electrically evoked DA was not affected by sulpiride or quinpirole. Instead, sulpiride induced increased DA release, and quinpirole presented an additive effect to the DA release inhibition caused by the CS protocol. Therefore, activation of D2 autoreceptors regulates DA release from presynaptic terminals but does not induce short-term desensitization of D2 autoreceptors.

Introduction

Typical antipsychotics are clinically used in the treatment of schizophrenia, especially to control psychotic symptoms such as delusions and hallucinations (Nikolaus et al., 2014). Such improvement led to the hypothesis that schizophrenia is caused by a supersensitive dopaminergic neurotransmission in the mesolimbic pathway (Lieberman et al., 1987) as the result of either an increased release of dopamine (DA) from presynaptic terminals or an increased response via postsynaptic D2 receptors (D2Rs) (Seeman, 2013). In agreement with this hypothesis, it has been shown that schizophrenic patients have an increased psychotic response to indirect DA agonists such as amphetamine (Laruelle et al., 1996; Abi-Dargham et al., 2004). A more recent hypothesis proposes that schizophrenia is initially caused by an impaired sensitization mechanism of D2 autoreceptors in response to increased levels of extracellular DA – with D2 autoreceptors sensitization instead of desensitization (Nikolaus et al., 2014). This view stresses the importance of understanding the critical factors controlling D2 autoreceptors desensitization to improve schizophrenia treatments.

In the present study, we investigated the role of D2 autoreceptors in desensitization and inhibition of DA release. We addressed this issue by using fixed potential amperometry, a technique that allows millisecond monitoring of *in vivo* DA release. Application of conditioning stimuli (CS, weaker electric prepulses) was used as a protocol to induce short-term desensitization of D2 autoreceptors and inhibition of DA release (Benoit-Marand et al., 2001). The effect of antipsychotics on these phenomena was studied by administering sulpiride systemically, infusing the D2R agonist into the nucleus accumbens (NAc) of DBA/J2 mice. This mice strain was used as an animal model of schizophrenia (Coleli et al., 2010; Young et al., 2009). Data analysis provided answers to the following questions: (i) Do results confirm the inhibitory effect of D2 autoreceptors on DA release? and (ii) Is activation of D2 receptors necessary to induce short-term desensitization?

Methods

Animals

Ten adult male DBA/2J mice from the Department of Psychology, University of Memphis (Memphis, TN) breeding stock, weighing 28-36g were used. Mice were maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) on a 12-h light/dark cycle (lights on, 7:00 a.m.) with water and food available *ad libitum*. All procedures were approved by the University of Memphis Institutional Animal Care and Use Committee and were in accordance with the guidelines of the Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health, 2002), the Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (National Research Council, 2003), and the Brazilian law (11.794/8 October 2008).

Fixed-Potential Amperometry (FPA)

DA release in the NAc was recorded *in vivo* in real time (10 k samples/s) by using a commercially available hardwired electrochemical recording system (eDAQ, Pty Ltd, CO). For every molecule of DA that is oxidized, two electrons are transferred to the eDAQ which consists of a potentiostat (EA161 Picostat) in conjunction with an analog-to-digital signal converter (A/D) recorder (e-Corder).

Mice were anesthetized with urethane (1.5 g/kg, i.p.). If needed, supplemental doses were administered until mice did not exhibit a pain response determined via tail pinch. Anesthetized mice were mounted in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, CA) located within a Faraday cage. They were maintained at $36 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ throughout the FPA procedure. The cranium was exposed and three burr holes were drilled, two unilaterally and one contralaterally, using a dental drill. A concentric bipolar stimulating electrode (SNE-100; Rhodes Medical Co., CA) was implanted into the medial forebrain bundle (MFB coordinates in mm: -2.1 AP from bregma; -1.1 ML from midline ; -4.8 DV from dura mater) and carbon fiber electrode (250 μm length \times 10 μm o.d.;

Thornel Type P, Union Carbide, Pittsburgh, PA) into the ipsilateral NAc core (coord. in mm: +1.2AP from bregma; -0.7ML from midline; -3.8DV from dura mater) (Franklin and Paxinos, 1997). An Ag/AgCl reference/auxiliary combination electrode was placed in contralateral cortical tissue -3.0 mm from bregma. A delay of 10-20 min allowed the recording electrode to stabilize before the start of the experiment.

Inhibition and desensitization of D2 autoreceptors by conditioning stimuli (CS)

The procedure to measure DA release by conditioning stimuli using FPA has been validated by Benoit-Marand et al. (2001). Variance in DA release was determined by applying a pair of test stimuli (T1 and T2; with ten 0.5ms duration 800 μ A pulses at 50 Hz separated by 10s) to the MFB six times every 30s to evoke DA efflux. Four sets of conditioning stimuli (5, 10, 20, and 40 pulses with 0.5ms for each pulse duration at 15 Hz) were given prior to T2 such that there was 0.3s between the end of the conditioning pulse train and initiation of T2. Between trials, the next T1 stimulus occurred approximately 20s after the previous T2 stimulus and was recorded in the absence of any conditioning pulses, thereby serving as a moving baseline response (100%). The effects of the conditioning pulses on T2-stimulated DA efflux relative to T1 were measured in ascending order (i.e., the effects of 5 conditioning pulses were determined first, followed by 10 conditioning pulses, followed by 20, etc.). This allowed for the determination of the effect of each conditioning pulse train on DA release for T2. The entire sequence took approximately 10 min to complete.

Materials and experimental design

Sulpiride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 10 ml/kg body weight acidified saline (0.9% NaCl). Low (3mg/kg) and high (50mg/kg) doses of sulpiride were chosen based on previous experiments in our laboratory (Boschen et al. 2011, Boschen et al., 2015) and from other studies (Gubernator et al., 2009; Centonze et al.,

2009, Rodgers et al., 1994). 10µg quinpirole (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was dissolved in 0.2µl saline as in Grilli et al., 2009.

Evoked DA release by CS procedure was always delivered before any drug treatment such that every mouse was its own control. Immediately after the end of the first sequence, Sulpiride (3 or 50mg/kg) was intraperitoneally administered and stimulations restarted after 15 min. Quinpirole was then infused into the NAc through a silica capillary immediately before stimulations restart.

Three mice received only intra-NAc quinpirole injections; three other mice each received a 3mg/kg sulpiride i.p. injection and 10µg quinpirole intra-NAc; and four other mice each received a 50mg/kg sulpiride i.p. injection and 10µg quinpirole intra-NAc.

Histology

At the end of each experiment, direct anodic current (100 µA for 10 sec) was applied to the stimulating electrode to produce a lesion. The mice brains were stored in 10% formalin plus 0.1% potassium ferricyanide and processed for cryostat sectioning. Placements of electrodes were determined by comparing the brain slices with coronal diagrams from Franklin and Paxinos Atlas (1997).

Statistical analyses

All data were analyzed using GraphPad Software (La Jolla, USA). Effects of drug treatments on DA release inhibition or D2 autoreceptors desensitization were analyzed via one-way ANOVA or two-way ANOVA with repeated measures when appropriate. Additional Newman-Keuls *post hoc* analyses were conducted to determine the nature of significant effects considered at $p < 0.05$.

Results

Histology

All carbon-fiber recording electrodes were located in the NAc core from 1.18 mm (5 mice) to 1.34 mm (3 mice) and 1.42 mm (2 mice) anterior to bregma (Figure 1A). Seven mice had the stimulating electrode placed in the MFB at nearly 1.9 mm posterior to bregma and three mice had the electrode at nearly 2.0 mm posterior to bregma (Figure 1B).

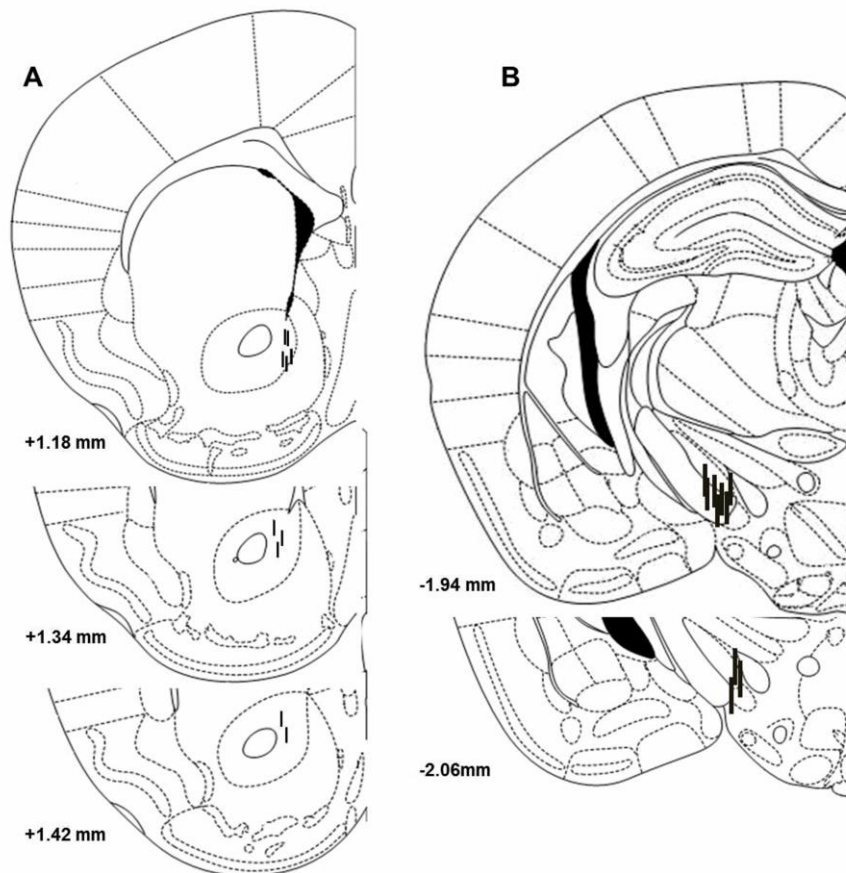


Figure 1. Localization of recording and stimulating electrodes in the mice NAc (A) and MFB (B). Adapted from Franklin and Paxinos, 1997.

Fixed-potential amperometry

Typical amperograms of evoked DA release are shown in Figure 2. Dopamine release in the NAc evoked by electric stimulation of the MFB is inhibited by previous dopamine release induced by CS.

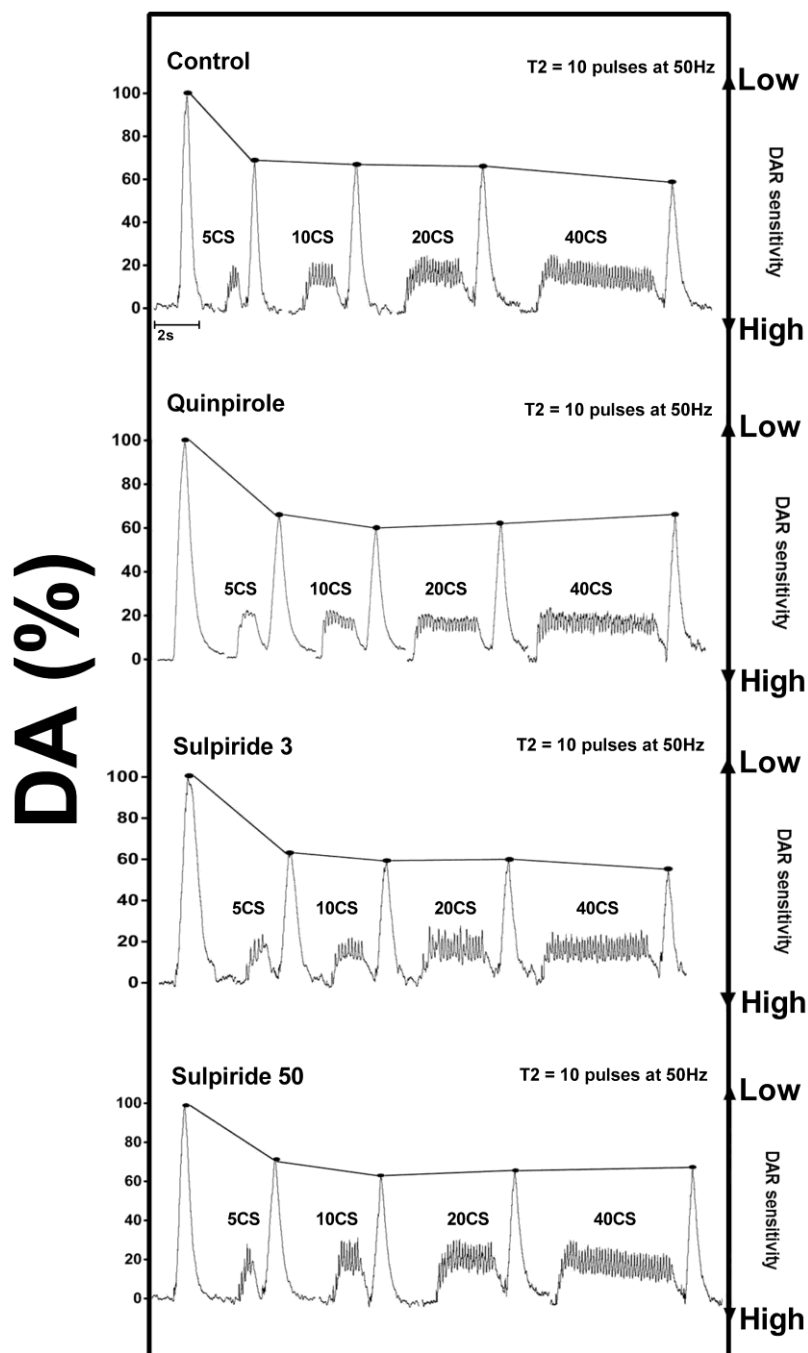


Figure 2. Typical amperograms of evoked DA release showing inhibition of DA release and desensitization of D2 autoreceptors of the nucleus accumbens. DA release was evoked by the electric stimulation of the medial forebrain bundle (10 pulses, 800 μ A, 50 Hz). The first peak of DA release was taken as the control (T1). When the same

stimulus used to evoke T1 was preceded by conditioning stimuli (CS, 5, 10, 20 and 40 pulses, 800 μ A, 15 Hz) inhibition of the second DA peak (T2) in relation to T1 was observed. However, such inhibition did not increase as increasing number of pulses were applied as CS because the D2 autoreceptors were desensitized.

As shown in Figures 1 and 2, the DA released by a CS applied just before the electric stimulation activates D2Rs caused inhibition of further DA release. It is expected that increased DA release will have a more pronounced impact in the inhibition of further DA release.

Effects of sulpiride and quinpirole on T1

If activation of D2 autoreceptor inhibits DA release, it is expected that their blockade would increase DA release. Accordingly, as shown in Figure 3, systemic administration of the D2R antagonist sulpiride increased DA release in a dose-dependent manner. In addition, such effect was completely reverted by the intra-NAc infusion of quinpirole in a dose that did not affect DA release [$F(5,85) = 7.52$; $p < 0.05$, ANOVA].

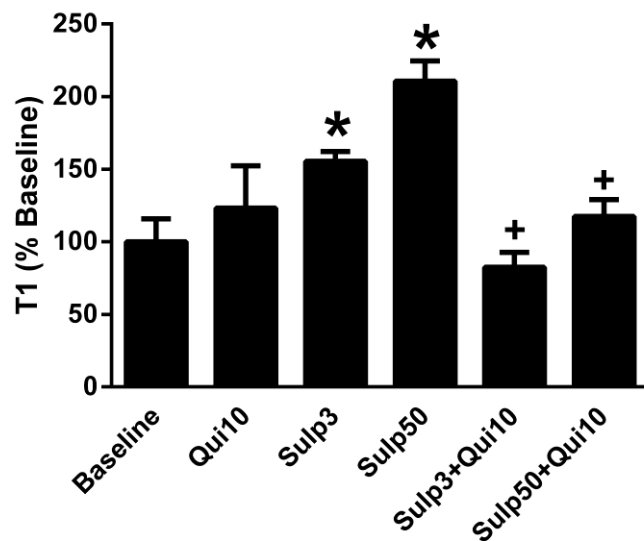


Figure 3. Effects of systemic administration of sulpiride on DA release in the nucleus accumbens core of mice. Data were collected from 10 mice and represents the mean \pm SEM area under the curve of the amperograms (T1 from Fig. 2 normalized by the control). DA release by a train of 10 electric pulses of 800 μ A, 0.5ms each, at 50 Hz applied to the medial forebrain bundle. The numbers of amperograms for each group were: control (N= 18); 10 μ g quinpirole (Qui 10, N =18); 3mg/kg sulpiride (Sulp3, N = 18); 50mg/kg sulpiride (Sulp 50, N = 18). * $p < 0.05$ compared to control; + $p < 0.05$ compared to Sulp 3 or Sulp 50, respectively; Newman-Keuls after one-way ANOVA.

Effects of sulpiride and quinpirole on T2

The main aim of this study was to test whether the desensitization of the D2Rs caused by the CS protocol was modulated by activation of D2 autoreceptors. Even a slight amount of DA release evoked by 5 CS caused an immediate inhibition of DA release (Fig. 2 and Fig. 4). However, the increased number of CS (10 and 20 CS) did not present an addictive inhibitory effect, which is taken as desensitization of the D2 autoreceptors. Nevertheless, after 40 CS, a significantly higher inhibition was observed [F (4,64) = 35.84, $p < 0.05$, ANOVA].

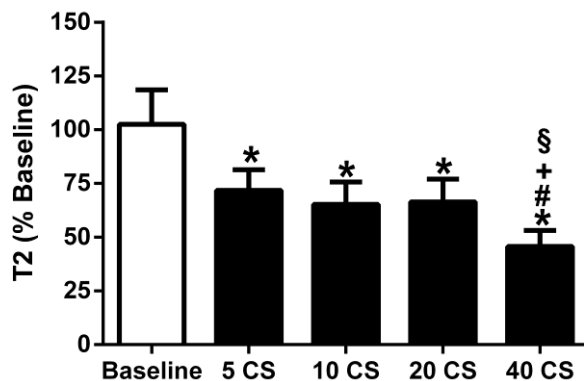


Figure 4. D2 autoreceptor desensitization. Data were collected from the 3 mice from the control group (N = 18 amperograms) and represent the mean \pm SEM area under the curve (T1 for Baseline and T2 for 5-40 CS normalized by T1; T1 and T2 are illustrated in

Fig.2). * $p < 0.05$ compared to Baseline; # $p < 0.05$ compared to 5 CS; + $p < 0.05$ compared 10 CS; § $p < 0.05$ compared to 20 CS.

If the desensitization shown in Figure 4 were dependent on the activation of the D2 autoreceptors, it was expected to be attenuated by D2R antagonists: sulpiride was expected to reduce T2. This prediction was tested under two conditions: after 5 CS, when little DA was released before T2; and after 40 CS, when a larger amount of DA was released before T2. Data was normalized by T2 of the control (untreated) group and are shown in Figure 5. Contrary to the prediction, under both conditions (after 5 CS and 40 CS), 3 mg/kg sulpiride treatment did not reduce T2; and 50 mg/kg sulpiride caused a significant increase of T2. Furthermore, infusion of 10 μ g quinpirole into the NAc of the sulpiride-treated mice caused a significant reduction of T2 compared to the groups treated only with 3 or 50 mg/kg sulpiride, respectively. One-way ANOVA showed significant drug effect after 5 CS [$F(5,85) = 14.04$; $p < 0.05$] and 40 CS [$F(5,85) = 13.03$; $p < 0.05$].

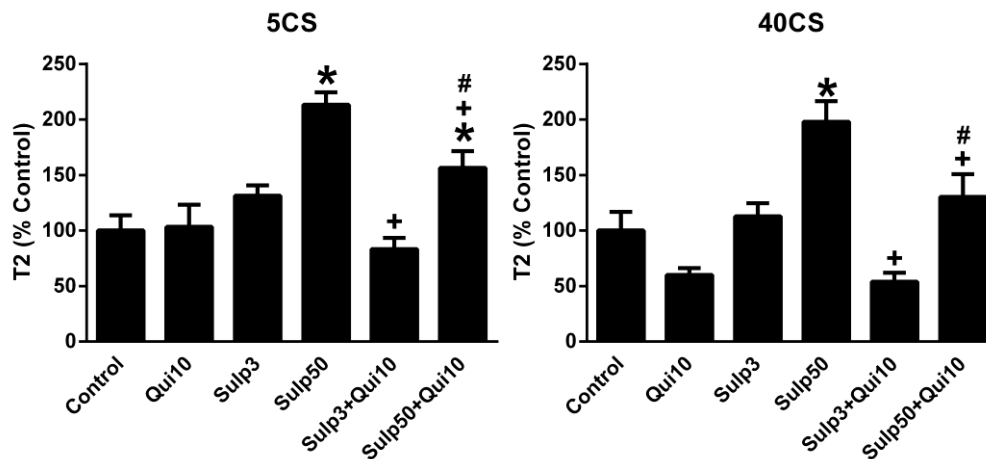


Figure 5. Effects of sulpiride and quinpirole on DA release inhibition induced by 5 and 40 CS. The relative change in the area of T2 (ten 0.5ms duration 800 μ A pulses at 50 Hz) after 5 and 40 CS (0.5ms pulse duration at 15 Hz) shows the effects of the drugs treatments in DA release inhibition. Data were collected from 10 mice and the number of amperograms for each group was: control (N= 18); 10 μ g quinpirole (Qui 10, N =18);

3mg/kg sulpiride (Sulp3, N = 18); 50mg/kg sulpiride (Sulp 50, N = 18). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to control; + $p < 0.05$ compared to the respective sulpiride dose (Sulp3 or Sulp50); # $p < 0.05$ compared to Qui10.

The effects of quinpirole and sulpiride on T2 are shown in Fig. 5. Instead of affecting D2 autoreceptor desensitization, these drugs seemed to have affected presynaptic D2 inhibition of T2. This hypothesis was confirmed by running separate two-way ANOVAs for quinpirole and sulpiride data. In each ANOVA, the drug treatment and the number of pulses used as CS were taken as independent factors. Significant effects were observed for quinpirole treatment [$F(1,17) = 26.48$; $p < 0.05$], CS [$F(3,51) = 11.36$; $p < 0.05$], and of the quinpirole treatment X CS interaction [$F(3,51) = 5.83$; $p < 0.05$]. In addition, significant effects were observed for the CS numbers [$F(3,51) = 5.90$; $p < 0.05$], sulpiride treatment [$F(2,34) = 5.04$; $p < 0.05$] and the interaction between the CS numbers and sulpiride treatment [$F(6,102) = 3.86$; $p < 0.05$]. As shown in Figure 6, the infusion of 10 μ g quinpirole *per se* into the NAc did not affect the release of DA even after 5 or 10 CS. However, in agreement with the hypothesis that activation of D2 autoreceptors inhibited T2, significantly lower amounts of DA were observed after quinpirole treatment when 20 and 40 CS were applied. In addition, when D2 autoreceptors were blocked by 50 mg/kg sulpiride, significantly higher T2 peaks were observed, which is coherent with the hypothesis that activation of the D2 autoreceptors by DA released by 5-40 CS inhibited the release of further DA.

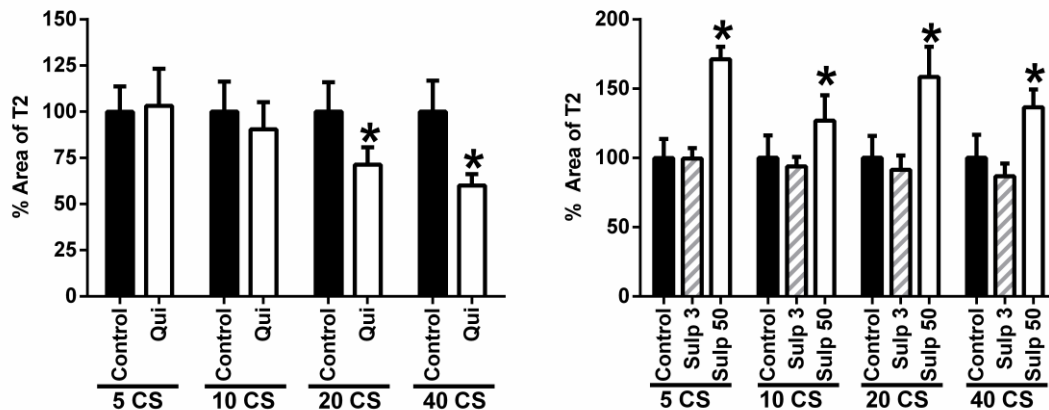


Figure 6. Effects of quinpirole and sulpiride on desensitization of D2 autoreceptors.

The percentage of the area of T2 from 10 μ g quinpirole, 3mg/kg sulpiride and 50 mg/kg sulpiride is relative to the area of T2 from the control group after 5, 10, 20 and 40 CS. Data were collected from 10 mice and the number of amperograms for each group was: control (N= 18); 10 μ g quinpirole (Qui 10, N =18); 3mg/kg sulpiride (Sulp3, N = 18); 50mg/kg sulpiride (Sulp 50, N = 18). Data are expressed as mean \pm SEM. * $p < 0.05$ compared to control.

Discussion

In this study, we investigated if activation of D2 autoreceptors inhibits DA release and induces D2 autoreceptors desensitization. Indeed, we showed that increasing the number of CSs causes both inhibition of further DA release and short-term desensitization of D2 autoreceptors. Regulation of DA release by D2 autoreceptors was confirmed by an increase in DA release after administration of the D2 receptor antagonist sulpiride. The increased release was observed both before and after application of the CSs. This effect was reverted by infusion of the D2 agonist quinpirole in a dose that did not affect DA release *per se*. On the other hand, neither sulpiride nor quinpirole affected short-term desensitization of D2 receptors. Instead, a higher dose of sulpiride caused increased DA release even when the CS protocol was used to induce desensitization. In addition, instead of deepening desensitization, quinpirole showed an additive effect on DA release inhibition. Therefore, these results confirm that activation of D2 autoreceptors regulates DA release from presynaptic terminals but did not support the hypothesis that short-term desensitization of D2 autoreceptors depends on activation of D2Rs.

The present results agree with *in vivo* amperometry (Dugast et al., 1997, Benoit-Marand et al., 2011), microdialysis (Usiello et al., 2000) and brain- slice voltammetry (Akopian and Walsh, 2007) studies which show increased DA release by antipsychotics. Our finding also agrees with whole-cell patch-clamp (Nimitvilai et al., 2014) and unitary-

cell (Koyama et al., 2014) electrophysiology studies that show inhibition of dopaminergic cell firing after quinpirole treatment in rats.

An electrophysiology study carried out by Nimitvilai and Brodie (2010) produced similar results as this present study. As we propose here, these authors used their finding to support that a short-term desensitization of D2 autoreceptors induced by DA release does not depend, at least solely, on activation of D2 DARs. Nimitvilai and Brodie found that incubation of rat midbrain slices in 0.5-5 μM DA solutions caused dose-dependent inhibition of the DA neurons firing rates. However when the DA concentration was increased, they observed a dose-dependent recovery (10-25 μM) and overshooting (50-100 μM) of the DA neurons firing rate. This is equivalent to the inhibition followed by desensitization that we observed when we applied 5-40 CSs to increase extracellular DA release. When the midbrain slices were incubated with the D2 agonist quinpirole, they observed inhibition, but not recovery, of the DA neurons firing rate. This would be equivalent to the fast desensitization that we observed in the present study. However, when they incubated the slices with the D1/D5 DARs partial agonist SKF38393, a mild desensitization was observed and SKF38393 and quinpirole caused a partial reversion of this inhibitory effect. This result suggests that D2 autoreceptors desensitization does not depend on D2R activation. This also suggests that desensitization is mediated by D1/D5R activation, at least in part.

Another possibility is that DA autoreceptors desensitization, at least partly, depends on activation of D3 DARs. In addition to D2, D3 receptors also function as autoreceptors in the regulation of DA release (Gainetdinov et al., 1994; Sokoloff et al., 1990; Tepper et al., 1997; Joseph et al., 2002). Furthermore, D3 receptor distribution in the NAc is higher than in the dorsal striatum (Booze and Wallace, 1995; Gurevich and Joyce, 1999). Zheng et al. (2011) have shown that desensitization of D3 receptors is achieved within 2 minutes of agonist treatment, which is a fast desensitization. Quinpirole is a D2 agonist with partial selectivity to D3 receptors, whereas DA has equivalent selectivity to D2 and D3 receptors (Fliestra and Levant, 1998; Bolaños-Jiménez et al., 2011). Therefore, it is likely that the desensitization induced by DA was mediated by D3 but not D2 activation.

Alternatively, what we observed in this study might have been caused by another phenomenon named DA inhibition reversal (DIR). DIR is known to be mediated by extended and concurrent stimulation of D2 and D1-like receptors and produces desensitization to D2 inhibition (Nimitvilai and Brodie, 2010).

The DA supersensitivity is considered a disturbed feedback response in schizophrenia (Seeman, 2013). Here this was studied in DBA/2J mice. This mice strain has been used as a schizophrenia model because their brains present high levels of DA (Mihre et al., 2005) and they fail to learn the prepulse inhibition task (Singer et al., 2009).

Although DA D2Rs are the primary target of antipsychotics (Seeman, 2006), it is possible that other receptors (e.g. DA D3 receptors) may contribute to alleviate psychotic symptoms without inducing as much tolerance or extrapyramidal effects (Freeman, 1997; Nuss et al., 2007). This is the case of amisulpride, an atypical antipsychotic clinically used because it selectively blocks limbic DA D2/D3 receptors and, at lower doses, presents preferential affinity to DA autoreceptors (Chabannes et al., 1998).

In summary, our main finding is that desensitization of D2 autoreceptors does not depend on activation of D2 receptors *per se*. This finding is important to better understand how antipsychotics work and may be valid for patients, since this study was carried out in DBA/2J mice, an established mouse model of schizophrenia. Understanding the antipsychotic desensitization mechanism will likely contribute to the development of more effective and selective antipsychotic drugs.

Acknowledgements: The authors are grateful for the technical assistance by Thomas A. Schneider, English revision by Alice Burns, and financial support from CAPES, CNPq and Fundação Araucária.

Conflict of Interest: the authors have no conflict of interest to report.

References

- Abi-Dargham A., Kegeles L.S., Zea-Ponce Y., Mawlawi O., Martinez D., Mitropoulou V., O'Flynn K., Koenigsberg H.W., Van Heertum R., Cooper T., Laruelle M. and Siever L.J. (2004) Striatal amphetamine-induced dopamine release in patients with schizotypal personality disorder studied with single photon emission computed tomography and [¹²³I]iodobenzamide. *Biol Psychiatry*. 55(10):1001-6.
- Akopian G. and Walsh J.P. (2007) Reliable long-lasting depression interacts with variable short-term facilitation to determine corticostriatal paired-pulse plasticity in young rats. *J Physiol*. 580:225-40.
- Benoit-Marand M., Ballion B., Borrelli E., Boraud T. and Gonon F. (2011) Inhibition of dopamine uptake by D2 antagonists: an in vivo study. *J Neurochem*. 116(3):449-58.
- Benoit-Marand M., Borrelli E. and Gonon F. (2001) Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. *J Neurosci*. 21(23):9134-41.
- Bolaños-Jiménez R., Arizmendi-Vargas J., Martínez-Zavala N., Carrillo-Ruiz J. D., Calderón Á.T.J.L., Jiménez-Ponce F. and Rivera-Silva G. (2011) Quinpirole Effects on the Dopaminergic System. *Br. J. Pharmacol. Toxicol*. 2(6): 310-317.
- Booze R.M. and Wallace D.R. (1995) Dopamine D2 and D3 receptors in the rat striatum and nucleus accumbens: use of 7-OH-DPAT and [¹²⁵I]-iodosulpride. *Synapse*. 19(1):1-13.
- Boschen S.L., Wietzikoski E.C., Winn P. and Da Cunha C. (2011) The role of nucleus accumbens and dorsolateral striatal D2 receptors in active avoidance conditioning *Neurobiol Learn Mem*. 96(2):254-62.
- Boschen, S.L, Andreatini, R. and Da Cunha C. (2015) Activation of postsynaptic D2 dopamine receptors in the rat dorsolateral striatum prevents the amnestic effect of systemically administered neuroleptics. *Behav. Brain Res*. *In press*
- Centonze D., Grande C., Usiello A., Gubellini P., Erbs E., Martín A.B., Pisani A., Tognazzi N., Bernardi G., Moratalla R., Borrelli E. and Calabresi P. (2003) Receptor Subtypes Involved in the Presynaptic and Postsynaptic Actions of Dopamine on Striatal Interneurons. *J. Neurosci*. 23(15):6245– 6254.
- Chabannes J.P., Pelissolo A., Farah S. and Gerard D. (1998) Evaluation of efficacy and tolerance of amisulpride in treatment of schizophrenic psychoses. *Encephale* 24(4):386-92.
- Colelli V., Fiorenza M.T., Conversi D., Orsini C. and Cabib S. (2010) Strain-specific proportion of the two isoforms of the dopamine D2 receptor in the mouse striatum: associated neural and behavioral phenotypes. *Genes Brain Behav* 9:703–711.
- Dugast C., Brun P., Sotty F., Renaud B. and Suaud-Chagny M.F. (1997) On the involvement of a tonic dopamine D2-autoinhibition in the regulation of pulse-to-pulse-evoked dopaminerelease in the rat striatum in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 355(6):716-9.
- Flietstra R.J. and Levant B. (1998) Comparison of D2 and D3 dopamine receptor affinity of dopaminergic compounds in rat brain. *Life Sci* 62(20): 1825-1831

- Freeman H.L. (1997) Amisulpride compared with standard neuroleptics in acute exacerbations of schizophrenia: three efficacy studies. *Int Clin Psychopharmacol.* 12 (2):11-7.
- Franklin K.B.J. and Paxinos G. (1997) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, San Diego.
- Gainetdinov R.R., Grekhova T.V., Sotnikova T.D. and Rayevsky K.S. (1994) Dopamine D2 and D3 receptor preferring antagonists differentially affect striatal dopamine release and metabolism in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 261:327–31.
- Grilli M., Zappettini S., Zoli M. and Marchi M. (2009) Pre-synaptic nicotinic and D2 receptors functionally interact on dopaminergic nerve endings of rat and mouse nucleus accumbens. *J. Neurochem.* 108, 1507–1514.
- Gubernator N.G., Zhang H., Staal R.G., Mosharov E.V., Pereira D.B., Yue M., Balsanek V., Vadola P.A., Mukherjee B., Edwards R.H., Sulzer D. and Sames D. (2009) Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. *Science.* 324(5933):1441-4.
- Gurevich E.V. and Joyce J.N. (1999) Distribution of Dopamine D3 Receptor Expressing Neurons in the Human Forebrain: Comparison with D2 Receptor Expressing Neurons. *Neuropsychopharmacol* 20:60–80.
- Joseph J.D., Wang Y.M., Miles P.R., Budygin E.A., Picetti R., Gainetdinov R.R., Caron M.G. and Wightman R.M. (2002) Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D₃ receptors. *Neurosci.* 112:39–49.
- Koyama S., Mori M., Kanamaru S., Sazawa T., Miyazaki A., Terai H. and Hirose S. (2014) Obesity attenuates D2 autoreceptor-mediated inhibition of putative ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Physiol. Rep.* 2(5): 1-10.
- Laruelle M., Abi-Dargham A., van Dyck C.H., Gil R., D'Souza C.D., Erdos J., McCance E., Rosenblatt W., Fingado C., Zoghbi S.S., Baldwin R.M., Seibyl J.P., Krystal J.H., Charney D.S. and Innis R.B. (1996) Single photon emission computerized tomography imaging of amphetamine-induced dopamine release in drug-free schizophrenic subjects. *Proc Natl Acad Sci* 93(17):9235-40.
- Lieberman J.A., Kane J.M. and Alvir J. (1987) Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. *Psychopharmacol.* 91:415–33.
- Mhyre T.R., Chesler E.J., Thiruchelvam M., Lungu C., Cory-Slechta D.A., Fry J.D. and Nikolaus S., Hautzel H. and Müller H.W. (2014) Neurochemical dysfunction in treated and nontreated schizophrenia – a retrospective analysis of in vivo imaging studies. *Rev. Neurosci.* 25(1): 25–96.
- Nimitvilai S. and Brodie M.S. (2010) Reversal of Prolonged Dopamine Inhibition of Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 333(2): 555-563.
- Nimitvilai S., Arora S., McElvain A. and Brodie S. (2012) Reversal of inhibition of putative dopaminergic neurons of the ventral tegmental area: interaction of GABA_B and D2 receptors. *Neurosci* 226:29–39.
- Nimitvilai S., Herman M., You C., Arora D.S., McElvaina M.A., Roberto M. and Brodie M.S. (2014) Dopamine D2 receptor desensitization by dopamine or corticotropin releasing factor in ventral tegmental area neurons is associated with increased glutamate release. *J Physiol.* 580:225-40.

- Nuss P., Hummer M. and Tessier C. (2007) The use of amisulpride in the treatment of acute psychosis. *Ther Clin Risk Manag* 3(1):3–11.
- Richfield E.K. (2005) Heritability, correlations and in silico mapping of locomotor behavior and neurochemistry in inbred strains of mice. *Genes Brain Behav* 4:209–228.
- Rodgers R.J., Nikulina E.M. and Cole J.C. Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze (1994) *Pharmacol Biochem Behav.* 49(4):985-95.
- Seeman P. (2006) Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. *Expert Opin Ther Targets* 10:515–31.
- Seeman P. (2013) Are dopamine D2 receptors out of control in psychosis? *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 46:146–152.
- Singer P., Feldon J. and Yee B.K. (2009) Are DBA/2 mice associated with schizophrenia-like endophenotypes? A behavioural contrast with C57BL/6 mice. *Neuropsychopharmacol* 206:677–698.
- Sokoloff P., Giros B., Martres M., Bouthene M. and Schwartz J. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature.* 347:146–51.
- Tepper J.M., Sun B.C., Martin L.P. and Creese I. (1997) Functional roles of dopamine D2 and D3 autoreceptors on nigrostriatal neurons analyzed by antisense knockdown in vivo. *J Neurosci.* 17:2519–30.
- Usiello A., Baik J.H., Rouge-Pont F., Picetti R., Dierich A., LeMeur M., Piazza P.V. and Borrelli E. (2000) Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. *Nature* 408, 199–203.
- Young, JW.; Light, GA.; Marston, HM.; Sharp, R.; Geyer, MA. (2009) The 5-choice continuous performance test: evidence for a translational test of vigilance for mice. *PLoS One* 4(1): e4227.
- Zheng M., Cheong S.Y., Min C., Jin M., Cho D.I. and Kim K.M. (2011) β -Arrestin2 plays permissive roles in the inhibitory activities of RGS9-2 on G protein-coupled receptors by maintaining RGS9-2 in the open conformation. *Mol Cell Biol.* 31:4887–4901.

6 DISCUSSÃO GERAL

Os dois estudos desta tese investigaram a participação dos receptores dopaminérgicos D2 na mediação dos efeitos amnésicos causados pelo antipsicótico sulpiride no DLS e nos mecanismos de regulação de liberação de DA pelos terminais dopaminérgicos no NAc. Os resultados apresentados mostram que receptores dopaminérgicos D2 pós-sinápticos, mas não pré-sinápticos, no DLS de ratos medeiam o aprendizado e memória de hábitos da esquivar ativa de duas vias e que o bloqueio desses receptores pelo antipsicótico típico sulpiride promove efeitos amnésicos. Também são apresentados dados que mostram que a dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 no NAc de camundongos não é afetada por doses pré-sináptica ou pré- e pós-sináptica desse antipsicótico.

Dentre os receptores dopaminérgicos, o subtipo D2 é o mais relacionado com a etiologia da esquizofrenia e com a manifestação de sintomas psicóticos, sendo por isso o maior alvo do tratamento com fármacos antipsicóticos (Nikolaus *et al.*, 2014; Seeman e Seeman, 2014; Roth e Rogan, 2010; Ginovart e Kapur, 2010; Nuss *et al.*, 2007).

O *splicing* alternativo do RNAm gera duas isoformas dos receptores D2. A isoforma longa (D2L) diferencia-se da isoforma curta (D2S) pela presença de 29 aminoácidos adicionais no terceiro loop intracelular. Além disso, enquanto D2S é expresso principalmente nos terminais pré-sinápticos como autoreceptores inibitórios, D2L encontra-se, sobretudo nos neurônios GABAérgicos pós-sinápticos do estriado (Usiello *et al.*, 2000; Vallone *et al.*, 2000; De Mei *et al.*, 2009). Como a expressão de ambas isoformas é equivalente no estriado dorsal de primatas e roedores (Khan *et al.*, 1998; Montmayeur *et al.*, 1991), manipulações farmacológicas tornam-se úteis na diferenciação entre elas. Doses relativamente maiores de agonistas e antagonistas de receptores D2 são necessárias para afetar D2L em relação a D2S (Starke *et al.*, 1989; Usiello *et al.*, 2000; Fusa *et al.*, 2002; Perreault *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2009).

O primeiro estudo desta tese mostrou que a administração sistêmica de uma dose preferencialmente pré-sináptica (1 mg/kg, i.p.) de sulpiride não prejudicou o

aprendizado e memória das respostas condicionadas de esquiva (CAR, do inglês *conditioned avoidance response*). Porém, uma dose pré- e pós-sináptica (25 mg/kg, i.p.) de sulpiride foi amnésica sobre CAR. Coerentemente, a infusão intra-DLS do agonista de receptores D2 quinpirole promove efeitos amnésicos sobre CAR somente quando administrado em conjunto com a dose pré-sináptica de sulpiride, mas previne os efeitos amnésicos ora causados pela dose preferencialmente pós-sináptica desse antagonista. Isso indica que a administração de antipsicóticos típicos não ocasiona somente o surgimento de sintomas extrapiramidais (Roth e Rogan, 2010, Ginovart e Kapur, 2010), mas também afetam processos de aprendizado e memória de procedimentos codificados pelo DLS (Knoltown *et al.*, 1996; Hikosaka *et al.*, 2008; Graybiel, 2005; Fukabori *et al.*, 2012).

Por muito tempo, as observações dos sinais motores da doença de Parkinson e a significativa redução de DA estriatal, levaram a associação do estriado dorsal a diversos distúrbios neurológicos de movimento (McGeer *et al.*, 1989; Gerfen *et al.*, 1990; Fearnley e Lees, 1991). Contudo, a crescente investigação sobre os NB revelou um sistema cuja função primordial é a seleção de ações apropriadas (Balleine *et al.*, 2007; Da Cunha *et al.*, 2009). Uma ação realizada adequadamente leva a um resultado de sucesso, o que reforça a escolha da ação que levou a essa consequência. Com o tempo, as sequências de ações podem estabelecer uma relação entre si criando uma rápida seleção de rotinas motoras que não dependem mais dos valores da recompensa e podem ser consideradas hábitos estímulo-resposta (S-R, do inglês *stimulus-response*). Essa lenta aquisição de memória de hábitos S-R envolve o DLS (Balleine *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2006), por receber informações dos córtex sensorial e motor sobre estímulos sonoros e visuais de objetos e partes do corpo, o que permite uma clara associação entre os estímulos percebidos no ambiente (luz acesa nos compartimentos da esquiva ativa) e as respostas motoras adequadas (cruzar para o outro compartimento antes de receber choque nas patas) (Yin *et al.*, 2006; Alloway *et al.*, 2006; Da Cunha *et al.*, 2009).

A redução de CAR observada apenas na sessão de teste da esquiva ativa, apesar da administração de sulpiride ter ocorrido pré-treino (24 horas antes), está de

acordo com estudos prévios (Boschen *et al.*, 2011; Wietzikoski *et al.*, 2012) e demonstra que a formação de hábitos S-R é modulada por receptores D2 no DLS.

Como mencionado anteriormente, um efeito adverso comum do uso de antipsicóticos típicos no tratamento da esquizofrenia é o surgimento de sintomas extrapiramidais. Tal reação é associada ao bloqueio de receptores D2 no estriado dorsal (Roth e Rogan, 2010, Ginovart e Kapur, 2010). Efeitos similares de redução de movimentos são observados em roedores tratados com antagonistas D2 (Dias *et al.*, 2009; Wadenberg *et al.*, 2000; Kravitz *et al.*, 2012). Contudo, as doses de sulpiride utilizadas em nosso estudo não aumentaram significativamente os níveis de falhas de fuga; e também não houve redução significativa de número de cruzamentos intertentativa como verificação de efeito cataléptico normalmente induzido por antipsicóticos típicos (Wadenberg *et al.*, 2000; Aguilar *et al.*, 2000; Boschen *et al.*, 2011). Além disso, a administração de sulpiride, em ambas as doses, preveniu o aumento do tempo de reação ao choque nas patas e o aumento de falhas de fuga causado pela infusão intra-DLS de quimpirole. Sendo assim, a redução de CAR observada com a administração sistêmica de sulpiride não parece ser resultado de prejuízo motor causado por esse tratamento, mas por seu efeito sobre o aprendizado e memória de procedimentos.

Dentro de um contexto geral, a ativação da via direta facilita a seleção de uma ação apropriada enquanto a ativação da via indireta inibe ações irrelevantes (Albin *et al.*, 1989; DeLong, 1990). Ou seja, com a progressão do aprendizado, um hábito pode ser adquirido como uma ação desejada e mantida enquanto ações inadequadas são eliminadas ao longo do tempo. No estriado, o sinal para esse aprendizado se faz pela liberação fásica de DA frente a um erro de predição (Schultz, 2007) que ativa a via direta e inibe a via indireta. Logo, disfunções na neurotransmissão dopaminérgica podem promover desequilíbrios na modulação dessas vias e prejuízos na seleção de ações (Keeler *et al.*, 2014; Surmeier, 2013; Cui *et al.*, 2013; Nicola, 2007).

Neste estudo, mostramos que a intensa inibição e a intensa ativação da via indireta resultaram em efeitos amnésicos sobre o aprendizado e memória de CAR. Nesse cenário, a escolha da ação apropriada (cruzar para o outro lado da esquiwa ativa) foi prejudicada pela administração sistêmica da dose pré-sináptica de sulpiride

associada com infusão intra-DLS de quimpirole, o que resultou numa inibição fortalecida da via indireta com impacto sobre aprendizado e memória de CAR. Por outro lado, a administração da dose pós-sináptica de sulpiride produziu uma ampla ativação da via indireta, o que também culminou na falha do processo de seleção de ações e redução de CAR (ver *Table 2* do item 3.1).

Os distúrbios verificados na atividade da via indireta estão presentes em doenças que envolvem os NB. A hipoativação desta via também é apresentada por pacientes esquizofrênicos que possuem expressão aumentada de receptores D2 nos MSNs do estriado e da concentração mesolímbica de DA (Abi-Dargham *et al.*, 2010; Simpson *et al.*, 2010). Por sua vez, também ocorre hiperativação da via indireta na doença de Parkinson como resultado da perda progressiva de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (Gerfen e Surmeier, 2011; DeLong e Wichmann, 2007). Isso sugere que as vias direta e indireta trabalham em conjunto, num fino equilíbrio produzido pela modulação dopaminérgica em receptores D1 e D2 (Calabresi *et al.*, 2014; Cazorla *et al.*, 2014; Surmeier, 2013; Cui *et al.*, 2013).

O excesso de DA mesolímbica está diretamente ligado à manifestação dos sintomas psicóticos da esquizofrenia, assim como à magnitude e rapidez da sua resposta ao tratamento com antipsicóticos (Abi-Dargham *et al.*, 2010). Contudo, os mecanismos pelos quais isso acontece ainda são desconhecidos. Por essa razão, modelos animais podem fornecer informações relevantes sobre as contribuições patogênicas desse fenótipo dopaminérgico.

Os modelos animais mais confiáveis no campo da pesquisa em esquizofrenia apresentam distúrbios na transmissão dopaminérgica subcortical (Abi-Dargham *et al.*, 2010; Lodge e Grace, 2007; Ozawa *et al.*, 2006). O segundo estudo desta tese utilizou camundongos DBA/2J, considerados modelo animal de esquizofrenia por apresentarem traços de comportamento e neuroquímicos que podem ser associados à fisiopatologia dessa doença (Colelli *et al.*, 2010). O comportamento de inibição pré-pulso representa uma forma de gatilho sensoriomotor (relacionado ao comportamento psicótico) que se encontra prejudicado em pacientes esquizofrênicos. Esse mesmo comportamento deficiente é apresentado pelos camundongos DBA/2J (Singer *et al.*, 2009). Além disso,

níveis elevados de DA e seus metabólitos, bem como do *turnover* dopaminérgico, foram relatados no estudo de Mihre e colaboradores (2005) ao comparar esta linhagem a outras 14 diferentes linhagens de camundongos.

Um importante, porém pouco abordado, aspecto da fisiopatologia da esquizofrenia encontra-se no papel dos autoreceptores D2. Diferenças na proporção das isoformas D2L e D2S no sistema corticoestriatal também podem contribuir para a variabilidade nos sintomas da esquizofrenia, visto que, déficits cognitivos em pacientes esquizofrênicos foram correlacionados com o aumento de D2S (Bertolino *et al.* 2009). Camundongos DBA/2J apresentam também uma maior expressão estriatal de D2S em relação a D2L (Colelli *et al.*, 2010). Dessa forma, o objetivo do segundo estudo aqui apresentado foi investigar os mecanismos de regulação de liberação de DA pelos autoreceptores D2 (isoforma D2S) pelos terminais dopaminérgicos da via mesolímbica em camundongos DBA/2J.

A amperometria de potencial fixo é uma técnica de monitoramento *in vivo* e em tempo real da liberação de DA que permite detectar variações de corrente de oxidação desse neurotransmissor na ordem de milissegundos. O procedimento amperométrico de aplicação de um número crescente de estímulos condicionantes (ECs – estímulos elétricos de baixa frequência (15 Hz) aplicados 300ms antes de um estímulo de alta frequência (50 Hz)) está bem descrito na literatura para avaliação da influência dos autoreceptores D2 na liberação de DA (Benoit-Marand *et al.*, 2001; Benoit-Marand *et al.*, 2011; Fielding *et al.*, 2013; Tye *et al.*, 2013).

Os autoreceptores D2 têm uma função importante no controle da concentração da DA extra sináptica por um mecanismo de retroalimentação negativa, em que a própria DA ativa esses receptores e, através de mecanismos intracelulares diversos (inclusive redução dos níveis de AMPc e de canais de cálcio), reduzem a liberação de DA na fenda sináptica (Rankin *et al.*, 2010; De Mei *et al.*, 2009; Missale *et al.*, 1998).

Os resultados apresentados no segundo artigo confirmaram essa bem estabelecida inibição de liberação de DA causada pela ativação de autoreceptores D2 (Benoit-Marand *et al.*, 2001). Isso foi demonstrado com o aumento de liberação de DA pela administração sistêmica das doses pré-sináptica e pré- e pós-sináptica de sulpiride

antes e após a aplicação dos ECs. Esse efeito ainda foi revertido pela co-administração intra-NAc de quimpirole em uma dose que não afetou a liberação de DA *per se*.

O aumento da liberação de DA frente a administração de antipsicóticos também foi demonstrado em outros estudos de amperometria (Dugast *et al.*, 2007; Benoit-Marand *et al.*, 2011), microdiálise (Usiello *et al.*, 2000) e de voltametria cíclica (Akopian e Walsh, 2007).

Uma hipótese atribui parte da disfunção dopaminérgica da esquizofrenia ao aumento da capacidade de síntese e liberação de DA (Ginovart e Kapur, 2010). Logo, outro mecanismo de regulação de liberação de DA que poderia ser implicado é o de dessensibilização dos autoreceptores D2. Nesse caso, um aumento na liberação de DA seria esperado após significativa ativação desses receptores, bem como uma redução da liberação de DA com o bloqueio dos mesmos.

A aplicação de ECs crescentes produziu uma dessensibilização de curto-prazo nos autoreceptores D2. Contudo, diferente do esperado, a infusão intra-NAc de quimpirole teve um efeito aditivo ao ECs na inibição de liberação de DA; e a administração sistêmica de sulpiride não afetou (dose preferencialmente pré-sináptica) ou aumentou a liberação de DA (dose pré- e pós-sináptica).

A dessensibilização de curto-prazo observada nesse estudo pode ser comparada ao fenômeno de reversão de inibição de DA (DIR, do inglês *DA inhibition reversal*) estudado por Nimitvilai e Brodie (2010). DIR é observado pela redução da taxa de disparo de neurônios dopaminérgicos da ATV após aumento sustentado do tônus desses neurônios (Nimitvilai e Brodie, 2010; Nimitvilai *et al.*, 2012). Esses pesquisadores mostraram, com registros eletrofisiológicos de neurônios dopaminérgico da ATV, que a aplicação aguda de uma baixa concentração (0,5 – 5,0 μM) de DA reduziu a taxa de disparo dos neurônios dopaminérgicos, mas que o aumento da concentração (10 – 100 μM) da DA produziu uma gradativa recuperação da taxa de disparo desses neurônios. Assim como encontramos em nosso estudo, o aumento da DA estriatal evocada pelos ECs promoveu a dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 evidenciada pela estabilização de liberação de DA em 5, 10 e 20 ECs. Os resultados de Nimitvilai e Brodie (2010) ainda mostraram que, diferente da DA,

a incubação com quimpirole não produziu DIR. Aqui, a infusão de quimpirole *per se* não afetou a dessensibilização de autoreceptores D2. Portanto, nossos resultados, em consonância com os descritos acima, sugerem que a dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 não depende exclusivamente da ativação desses receptores.

Nimitvilai e Brodie (2010) mostraram ainda que a inibição da taxa de disparo dos neurônios dopaminérgicos da ATV induzida por quimpirole foi atenuada quando esta droga é aplicada após a indução de DIR por uma alta concentração de DA (10 μ M). Essa atenuação da inibição dos disparos neuronais por quimpirole foi bloqueada pelo antagonista de receptores dopaminérgicos D1/D5 SCH39166. Isso sugere que a dessensibilização de curto-prazo observada em nossos estudos pode ser parcialmente mediada pela ativação de receptores D1/D5.

Foi demonstrado que ocorre a formação de heterodímeros funcionais de receptores D1/D2 que, após ativação pelo ligante, estimulam uma via intracelular regulada pela proteína $G\alpha_q$ que culmina na liberação de cálcio (Lee *et al.*, 2004; Rashid *et al.*, 2007; Rankin *et al.*, 2010). Considerando que a distribuição de receptores D5 no estriado é quase inexistente (De Mei *et al.*, 2009; Missale *et al.*, 1998), os receptores D1 parecem ser o candidato provável para mediar, juntamente com os receptores D2, os efeitos de dessensibilização de curto-prazo.

A dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 produzida por DA também pode ter sido causada pela atuação de endocanabinóides (anandamida e 2-AG) sintetizados a partir da ativação de receptores D2 pós-sinápticos pela DA. A síntese de endocanabinóides é estimulada pela ativação sinérgica de receptores D2 pós-sinápticos, receptores glutamatérgicos mGluR1/5 e aumento intracelular de cálcio. Os endocanabinóides ativam receptores CB1 presentes em neurônios pré-sinápticos o que resulta numa redução dos níveis intracelulares de AMPc levando, por sua vez, a redução da probabilidade de liberação de glutamato e GABA (Zhang e Sulzer, 2012; Calabresi *et al.*, 2014). Apesar de evidências diretas da presença de receptores CB1 nos terminais dopaminérgicos serem escassas, foi demonstrado recentemente que a inibição de liberação de DA por autoreceptores D2 é atenuada pela ativação de

receptores CB1 (O'Neill et al, 2009) o que indica a existência de um mecanismo indireto de controle de liberação de DA (Zhang e Sulzer, 2012).

Segundo Seeman (2013), o quadro de psicose de pacientes esquizofrênicos seria decorrente de uma elevação da conversão de receptores dopaminérgicos D2 de um estado de repouso de baixa afinidade por DA (*D2 Low*) para um estado funcional de alta afinidade por DA (*D2 High*). O retorno de *D2 High* para *D2 Low* é controlado por mecanismos proteicos e enzimáticos que promovem a dessensibilização de *D2 High* e que estão reduzidos em pacientes esquizofrênicos (Seeman, 2013). Dessa forma, ainda é possível que o aumento da liberação de DA evocada pelos ECs tenha promovido a conversão de *D2 High* para *D2 Low*, resultando na dessensibilização de curto-prazo demonstrada. Uma evidência importante que apoia essa afirmação foi apresentada por Wu e colaboradores (2007) num estudo em que mostraram que a interconversão de *D2 High* para *D2 Low* pode acontecer após alguns segundos, ou até menos, de estimulação dos mesmos.

A dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 produzida por DA, mas não por quimpirole, pode ainda ter sido parcialmente mediada por receptores D3. Quimpirole é um agonista de receptores D2, com afinidade parcial para receptores D3, enquanto a DA tem afinidade equivalente para ambos os subtipos de receptores. Além disso, foi verificado que a dessensibilização mediada pela ativação de receptores D3 tem início rápido, acontecendo em até 2 minutos após tratamento com agonista (Zheng *et al.*, 2011). Outro aspecto importante é que os receptores D3 também podem ser distribuídos nos terminais pré-sinápticos de neurônios dopaminérgicos (Gainetdinov *et al.*, 1994; Sokoloff *et al.*, 1990; Joseph *et al.*, 2002), especialmente no NAc onde ocorrem em maior concentração do que no estriado dorsal (McNamara *et al.* 2006; Wang *et al.* 2000; Gurevich e Joyce, 1999; Tremblay *et al.* 1999; Booze e Wallace, 1995).

A participação de receptores D3 nos mecanismos fisiopatológicos da esquizofrenia vem ganhando maior atenção, visto que o bloqueio de receptores D3 se mostrou eficaz em aliviar os sintomas psicóticos de pacientes esquizofrênicos sem causar efeitos extrapiramidais significativos (Freeman, 1997; Nuss *et al.*, 2007). A

melhor compreensão dos mecanismos que controlam a dessensibilização de autoreceptores D2 pode contribuir para o desenvolvimento de fármacos antipsicóticos mais seletivos e efetivos.

7 CONCLUSÕES

A partir dos dados apresentados no primeiro artigo desta tese, é possível concluir que o DLS é uma região crítica para a promoção dos efeitos amnésicos causados pelo antagonista de receptores D2 – sulpiride – no aprendizado e memória de CAR. Enquanto o bloqueio de receptores D2 pré-sinápticos não é suficiente, o bloqueio de receptores D2 pós-sinápticos é necessário para produzir tais efeitos.

Considerando os dados do segundo artigo conclui-se que a dessensibilização de curto-prazo de autoreceptores D2 no NAc de camundongos DBA/2J não depende exclusivamente da ativação desses receptores, e por isso, não é afetada pelo tratamento com sulpiride.

Esses resultados auxiliam no entendimento de como os antipsicóticos atuam nos receptores D2 pré- e pós-sinápticos do estriado para a produção dos seus efeitos terapêuticos e adversos, contribuindo para o estudo de melhores opções farmacológicas para o tratamento da esquizofrenia. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma droga com maior especificidade para receptores D2 pós-sinápticos produziria um agravamento no quadro cognitivo dos pacientes esquizofrênicos. Contudo, uma droga com maior especificidade para receptores D2 pré-sinápticos seria uma boa alternativa, pois além de inibir liberação de DA mesolímbica não afetaria os sintomas cognitivos dos pacientes.

REFERÊNCIAS

- ABI-DARGHAM, A.; SLIFSTEIN, M.; KEGELES, L.; LARUELLE, M. Dopamine dysfunction in schizophrenia. In: IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D.; DUNNET, S.B, BJÖRKLUND, A. **Dopamine handbook**. Nova York: Oxford University Press, 2010. p. 540-557.
- ACEVES, J.J; RUEDA-OROSCO, P.E; HERNADEZ-MARTINEZ, R, GALARRAGA E, BARGAS J. Bidirectional plasticity in striatonigral synapses: a switch to balance direct and indirect basal ganglia pathways. **Learning and Memory** 18 (12): 764-73, 2011.
- AGUILAR, MA; MARÍ-SANMILLÁN, MI; MORANT-DEUSA, JJ; MIÑARRO, J. Different inhibition of conditioned avoidance response by clozapine and DA D1 and D2 antagonists in male mice. **Behavioral Neuroscience**, 114: 389-400, 2000.
- AKOPIAN G.; WALSH J.P. Reliable long-lasting depression interacts with variable short-term facilitation to determine corticostriatal paired-pulse plasticity in young rats. **J Physiol**. 580: 225-40, 2007.
- ALBIN, RL.; YOUNG, AB.; PENNEY, JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neuroscience** 12(10): 366–375, 1989.
- ALEXANDER, G.E.; DELONG, M.R.; STRICK, P.L. Parallel organization of functionally segregated circuits linking basal ganglia and cortex. **Annual Review of Neuroscience**, 9, 357-381, 1986.
- ALLOWAY, KD.; LOU, L.; NWABUEZE-OGBO, F.; CHAKRABARTI, S. Topography of cortical projections to the dorsolateral neostriatum in rats: multiple overlapping sensorimotor pathways. **The Journal of Comparative Neurology** 499: 33–48, 2006.
- AMERICAN PSYCHIATRY ASSOCIATION. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental disorders - DSM-5**. 5ªed. Washington: American Psychiatric Association, 2013. Antioxidants & Redox Signaling 7(5-6): 685-693.
- ARAÚJO, AC.; NETO, LF. A nova classificação americana para os transtornos mentais – o DSM-5. **Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva** XVI (1): 67 – 82, 2014.
- ARVANITIS, L.A., MILLER, B.G. Multiple fixed-doses of “Seroquel” (quetiapine) in patients with acute exacerbation of schizophrenia: a comparison with haloperidol and placebo. The Seroquel Trial 13 Study Group. **Biological Psychiatry**. 42(4): 233-246, 1997.

AUGUSTIN, SM.; BEELER, JA.; MCGEHEE, DS.; ZHUANG, X. Cyclic AMP and Afferent Activity Govern Bidirectional Synaptic Plasticity in Striatopallidal Neurons. **The Journal of Neuroscience** 34(19): 6692–6699, 2014.

BALLEINE, BW.; DELGADO, MR.; HIKOSAKA, O. The role of the dorsal striatum in reward and decision-making. **The Journal of Neuroscience** 27: 8161-8165, 2007.

BENINGER, RJ. The role of dopamine in locomotor activity and learning. **Brain Research** 287:173-196, 1983.

BENINGER, RJ.; WASSERMAN, J.; ZANIBBI, K.; CHARBONNEAU, D.; MANGELS, J.; BENINGER, BV. Typical and atypical antipsychotic medications differentially affect two nondeclarative memory tasks in schizophrenic patients: a double dissociation. **Schizophrenia research** 61(2-3): 281-92, 2003.

BENINGER, RJ. Dopamine and incentive learning: a framework for considering antipsychotic medication effects. **Neurotoxicity research** 10(3-4): 199-209, 2006.

BENOIT-MARAND, M.; BALLION, B.; BORRELLI, E.; BORAUD, T.; GONON F. Inhibition of dopamine uptake by D2 antagonists: an in vivo study. **The Journal of Neurochemistry** 116(3): 449-58, 2011.

BENOIT-MARAND, M.; BORRELLI, E.; GONON F. Inhibition of dopamine release via presynaptic D2 receptors: time course and functional characteristics in vivo. **The Journal of Neuroscience** 21(23): 9134-41, 2001.

BERTOLINO, A.; FAZIO, L.; CAFORIO, G.; BLASI, G.; RAMPINO, A.; ROMANO, R.; DI GIORGIO, A.; TAURISANO, P.; PAPP, A.; PINSONNEAULT, J.; WANG, D.; NARDINI, M.; POPOLIZIO, T.; SADEE, W. Functional variants of the dopamine receptor D2 gene modulate prefronto-striatal phenotypes in schizophrenia. **Brain** 132: 417–425, 2009.

BOLAM, J.P.; HANLEY, J.J.; BOOTH, P.A.; BEVAN MD. Synaptic organization of the basal ganglia. **Journal of Anatomy and Physiology** 196 (4): 527-42, 2000.

BOOZE R.M; WALLACE D.R. Dopamine D2 and D3 receptors in the rat striatum and nucleus accumbens: use of 7-OH-DPAT and [125I]-iodosulpride. **Synapse** 19(1): 1-13, 1995.

BORTOLANZA, M.; WIETZIKOSKI, EC.; BOSCHEN, SL.; DOMBROWSKI, PA.; LATIMER, M.; MACLAREN, DA.; WINN, P.; DA CUNHA C. Functional disconnection of the substantia nigra pars compacta from the pedunculo-pontine nucleus impairs learning of a conditioned avoidance task. **Neurobiology of Learning and Memory** 94(2): 229-39, 2010.

BOSCHEN, S.L.; WIETZIKOSKI, E.C.; WINN, P. DA CUNHA, C.. The role of nucleus accumbens and dorsolateral striatal D2 receptors in active avoidance conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory** 96 (2): 254-62, 2011.

BRISCHOUX, F; CHAKRABORTY, S; BRIERLEY, DI; UNGLESS, MA. Phasic excitation of dopamine neurons in ventral VTA by noxious stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106: 4894-4899, 2009.

BROWN, AS. The environment and susceptibility to schizophrenia. **Progress in Neurobiology** 93(1): 23–58, 2011.

BUCHANAN, R.W. Clozapine: efficacy and safety. **Schizophrenia Bulletin**. 21(4): 579-591, 1995.

CALABRESI, P., B. PICCONI, TOZZI A, DI FILIPPO M. Dopamine-mediated regulation of corticostriatal synaptic plasticity. **Trends in Neurosciences** 30(5): 211-9, 2007.

CALABRESI, P.; PICCONI, B.; TOZZI, A.; GHIGLIERI, V.; DI FILIPPO, M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nature Neuroscience** 17 (8): 1022-1030, 2014.

CAZORLA, M.; DE CARVALHO, F.D.; CHOCHAN, MO.; SHEGDA, M; CHUHMA, N.; RAYPORT, S.; AHMARI, S.E.; MOORE, H.; KELLENDONK, C. Dopamine D2 Receptors Regulate the Anatomical and Functional Balance of Basal Ganglia Circuitry **Neuron** 81: 153–164, 2014.

CENTONZE, D., GRANDE, C., USIELLO, A., GUBELLINI, P., ERBS, E., MARTÍN, A.B., PISANI, A., TOGNAZZI, N., BERNARDI, G., MORATALLA, R., BORRELLI, E. CALABRESI, P. Receptor Subtypes Involved in the Presynaptic and Postsynaptic Actions of Dopamine on Striatal Interneurons. **J. Neurosci.** 23(15): 6245– 6254, 2003.

COLELLI, V.; FIORENZA, MT.; CONVERSI, D.; ORSINI, C.; CABIB, S. Strain-specific proportion of the two isoforms of the dopamine D2 receptor in the mouse striatum: associated neural and behavioral phenotypes. **Genes, Brain and Behavior** 9: 703–711, 2010.

COPOLOV, D.L., LINK, C.G., KOWALCYK, B. A multicenter, double-blind, randomized comparison of quetiapine (ICI 204,636, “Seroquel”) and haloperidol in schizophrenia. **Psychol Med.** 30(1): 95-105.

CUI, G.; JUN, SB.; JIN, X.; PHAM, MD.; VOGEL, SS. LOVINGER, DM.; COSTA, RM. Concurrent activation of striatal direct and indirect pathways during action initiation. **Nature** 494(7436): 238–242, 2013.

DA CUNHA C.; ANGELUCCI ME.; CANTERAS NS.; WONNACOTT S.; TAKAHASHI RN. The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities **Cellular and molecular neurobiology**. 22(3): 227-237, 2002.

DA CUNHA C.; WIETZIKOSKI S.; WIETZIKOSKI EC.; MIYOSHI E.; FERRO MM.; ANSELMO-FRANCI JA.; CANTERAS NS. Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of a memory system independent of the hippocampal memory system. **Neurobiology of Learning and Memory** 79(3):236-42, 2003.

DA CUNHA, C.; WIETZIKOSKI EC.; DOMBROWSKI PA.; BORTOLANZA M.; SANTOS LM.; BOSCHEN SL.; MIYOSHI E. Learning processing in the basal ganglia: a mosaic of broken mirrors. **Behavioural Brain Research** 199(1): 157-170, 2009.

DE MEI, C.; RAMOS, M.; IITAKA, C.; BORRELLI, E. Getting specialized: presynaptic and postsynaptic dopamine D2 receptors. **Current Opinion in Pharmacology** 9(1): 53–58, 2009.

DEL-MONTE, J.; CAPDEVIELLE, D.; GÉLY-NARGEOT, MC.; YAZBEK, H.; PUIPIER, F.; BOULENGER, JP.; RAFFARD, S. Evolution of the concept of apathy: the need for a multifactorial approach in schizophrenia. **Encephale** 1: 57-63, 2013.

DELONG, MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends in Neurosciences** 13(7): 281-285, 1990.

DELONG, MR, WICHMANN, T. Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. **Archives of Neurology**, 64: 20-24, 2007.

DI FILIPPO, M; PICCONI, B; TANTUCCI, M; GHIGLIERI, V; BAGETTA, V; SGOBIO, C; TOZZI, A; PARNETTI, L; CALABRESI, P. Short-term and long-term plasticity at corticostriatal synapses: implications for learning and memory. **Behavioural Brain Research** 199: 108-118, 2009.

DIAS FRC.; CAREY RJ.; CARRERA MP. Apomorphine-induced context-specific behavioural sensitization is prevented by the D1 antagonist SCH 23390 but potentiated and uncoupled from contextual cues by the D2 antagonist sulpiride. **Psychopharmacology** 209:137-151, 2009.

DOMBROWSKI PA, MAIA TV, BOSCHEN SL, BORTOLANZA M, WENDLER E, SCHWARTING RK, BRANDÃO ML, WINN P, BLAHA CD, DA CUNHA C. Evidence that conditioned avoidance responses are reinforced by positive prediction errors signaled by tonic striatal dopamine. **Behavioural Brain Research** 241: 112-119, 2012.

DOYON, J.; BELLEC, P.; AMSEL, R.; PENHUNE, V.; MONCHI, O.; CARRIER, J.; LEHÉRICY, S.; BENALI, H. Contributions of the basal ganglia and functionally related brain structures to motor learning. **Behavioural Brain Research** 199 (1): 61-75, 2009.

DUGAST, C.; BRUN, P.; SOTTY, F.; RENAUD, B.; SUAUD-CHAGNY, MF. On the involvement of a tonic dopamine D2-autoinhibition in the regulation of pulse-to-pulse-evoked dopamine release in the rat striatum in vivo. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacology**. 355(6): 716-9, 1997.

FEARNLEY, JM.; LEES, AJ. Aging and Parkinson's-disease-substantia-nigra regional selectivity. **Brain** 114: 2283-2301, 1991.

FIELDING, JR.; ROGERS, TD.; MEYER, AE.; MILLER, MM.; NELMS, JL.; MITTLEMAN, G.; BLAHA, CD.; SABLE, HJK. Stimulation-evoked dopamine release in the nucleus accumbens following cocaine administration in rats perinatally exposed to polychlorinated biphenyls. **Toxicological Sciences** 136(1): 144–153, 2013.

FISONE, G.; HAKANSSON, K.; BORGKVIS,TA.; SANTINI, E. Signaling in the basal ganglia: postsynaptic and presynaptic mechanisms. **Physiology & behavior** 92(1-2): 8-14, 2007.

FREEMAN H.L. Amisulpride compared with standard neuroleptics in acute exacerbations of schizophrenia: three efficacy studies. **International Clinical Psychopharmacology** 12 (2): 11-7, 1997.

FUKABORI, R.; OKADA, K.; NISHIZAWA, K.; KAI, N.; KOBAYASHI, K.; UCHIGASHIMA, M.; WATANABE, M.; TSUTSUI, Y.; KOBAYASHI K. Striatal direct pathway modulates response time in execution of visual discrimination. **The European Journal of Neuroscience** 35(5): 784-97, 2012.

FUSA K, SAIGUSA T, KOSHIKAWA N, COOLS AR. Tyrosine-induced release of dopamine is under inhibitory control of presynaptic dopamine D2 and, probably, D3 receptors in the dorsal striatum, but not in the nucleus accumbens. **European Journal of Pharmacology** 448: 143–150, 2002.

GAINETDINOV R.R., GREKHOVA T.V., SOTNIKOVA T.D. AND RAYEVSKY K.S. Dopamine D2 and D3 receptor preferring antagonists differentially affect striatal dopamine release and metabolism in conscious rats. **European Journal of Pharmacology** 261:327–31, 1994.

GERFEN, C.R.; ENGBER, T.M.; MAHAN, L.C. SUSEL, Z.; CHASE, TN.; MONSMA, FJ. JR.; SIBLEY, DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. **Science**. 250 (4986): 1429-32, 1990.

GERFEN, C.R.; SURMEIER, D.J. Modulation of striatal projections systems. **Annual Review of Neuroscience**. 34: 441-66, 2011.

GINOVART, N.; KAPUR, S. How antipsychotics work: linking receptors to response. In: IVERSEN, L.L.; IVERSEN, S.D.; DUNNET, S.B, BJÖRKLUND, A. **Dopamine handbook**. Nova York: Oxford University Press, 2010. p. 540-557.

GRACE, AA.; BUNNEY, BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: single spike firing. **The Journal of Neuroscience** 4: 2866-2876, 1984a.

GRACE, AA.; BUNNEY, BS. The control of firing pattern in nigral dopamine neurons: burst firing. **The Journal of Neuroscience** 4: 2877-2890, 1984b.

GRAYBIEL, A. M. The basal ganglia: learning new tricks and loving it. **Current Opinion in Neurobiology** 15 (6): 638-44, 2005.

GRAY N.S., HEMSLEY, D.R., GRAY, J.A. Abolition of latent inhibition in acute, but not chronic schizophrenics. **Neurol Psychiatry Brain Res** 1: 83–89, 1992.

GRILLI, M., ZAPPETTINI, S., ZOLI, M., MARCHI, M. Pre-synaptic nicotinic and D2 receptors functionally interact on dopaminergic nerve endings of rat and mouse nucleus accumbens **J. Neurochem**. 108: 1507–1514, 2009

GUBERNATOR, N.G., ZHANG, H., STAAL, R.G., MOSHAROV, E.V., PEREIRA, D.B., YUE, M., BALSANEK, V., VADOLA, P.A., MUKHERJEE, B., EDWARDS, R.H., SULZER, D., SAMES, D. Fluorescent false neurotransmitters visualize dopamine release from individual presynaptic terminals. **Science**. 324(5933):1441-4, 2009.

GUREVICH, EV.; JOYCE, JN. Distribution of Dopamine D3 Receptor Expressing Neurons in the Human Forebrain: Comparison with D2 Receptor Expressing Neurons **Neuropsychopharmacology** 20:60–80, 1999.

HEINZ, A.; SCHLAGENHAUF, F. Dopaminergic dysfunction in schizophrenia: salience attribution revisited. **Schizophrenia Bulletin** 36 (3): 472–485, 2010.

HIKOSAKA O.; SESACK SR.; LECOURTIER L.; SHEPARD PD. Habenula: crossroad between the basal ganglia and the limbic system. **Journal of Neuroscience** 28: 11825-11829, 2008.

HOFFMAN H.S., SEARLE, J.L. Acoustic variables in the modification of startle reaction in the rat. **J Comp Physiol Psychol** 60: 53–58, 1965.

HOOPER KC.; BANKS DA.; STORDAHL LJ.; WHITE IM.; REBEC GV.: Quinpirole inhibits striatal and excites pallidal neurons in freely moving rats. **Neuroscience Letters** 237: 69-72, 1997.

HOWES, OD.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version iii—the final common pathway. **Schizophrenia Bulletin** 35 (3): 549–562, 2009.

JOSEPH J.D., WANG Y.M., MILES P.R., BUDYGIN E.A., PICETTI R., GAINETDINOV R.R., CARON M.G. AND WIGHTMAN R.M. Dopamine autoreceptor regulation of release and uptake in mouse brain slices in the absence of D₃ receptors. **Neuroscience** 112:39–49, 2002.

KANE, J., HONIGFELD, G., SINGER, J., MELTZER, H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double-blind comparison with chlorpromazine. **Arch Gen Psychiatry**, 45(9): 789-796, 1988.

KARAM, CS; BALLON, JS; BIVENS, NM; FREYBERG, Z; GIRGIS, RR; LIZARDI-ORTIZ, JE; MARKX, S; LIEBERMAN, JA; JAVITCH, JA. Signaling pathways in schizophrenia: emerging targets and therapeutic strategies. **Cell**, v. 31, p. 381-390, 2010.

KEELER, JF.; PRETSELL, DO.; ROBBINS, TW. Functional implications of dopamine D1 vs D2 receptors: A 'Prepare and Select' model of the striatal direct vs. indirect pathways. **Neuroscience**, 14: 584-593, 2014.

KHAN, Z.; MRZLJAK, L.; GUTIERREZ, A.; DE LA CALLE A.; GOLDMAN-RAKIC, P. Prominence of the dopamine D2 short isoform in dopaminergic pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 95: 7731–7736, 1998.

KIRKPATRICK B. Recognizing primary vs secondary negative symptoms and apathy vs expression domains. **The Journal of Clinical Psychiatry** 75(4): e09, 2014.

KNOWLTON BJ.; MANGELS JA.; SQUIRE LR. A neostriatal habit learning system in humans. **Science** 273: 1399-1402, 1996.

KRAVITZ, AV.; TYE, LD.; KREITZER, AC. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. **Nature Neuroscience** 15 (6): 816-819, 2012.

KRINGELBACH, ML.; BERRIDGE, KC. Towards a functional neuroanatomy of pleasure and happiness. **Trends in Cognitive Sciences** 13 (11): 479-489, 2009.

LAVIOLETTE, SR. Dopamine modulation of emotional processing in cortical and subcortical neural circuits: evidence for a final common pathway in schizophrenia? **Schizophrenia bulletin**, 33: 971-981, 2007.

LEE, SP.; SO, CH.; RASHID AJ.; VARGHESE, G.; CHENG, R.; LANÇA, AJ.; O'DOWD, BF.; GEORGE, SR. Dopamine D1 and D2 receptor co-activation generates a

novel phospholipase C-mediated calcium signal. **Journal of Biological Chemistry** 279(34): 35671-35678, 2004.

LIEBERMAN J.A., KANE J.M., ALVIR J. Provocative tests with psychostimulant drugs in schizophrenia. **Psychopharmacology** 91:415–33, 1987.

LODGE, DJ.; GRACE, AA. Aberrant hippocampal activity underlies the dopamine dysregulation in an animal model of schizophrenia. **The Journal of Neuroscience** 27 (42): 11424-11430, 2007.

LOVINGER DM. Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. **Neuropharmacology** 58: 951-961, 2010.

LUBOW, R.E., MOORE, A.U. Latent inhibition: the effect of non-reinforced pre-exposure to the conditional stimulus. **J Comp Physiol Psychol** 66: 688–694, 1959.

MATSUMOTO, M.; HIKOSAKA, O. Two types of dopamine neuron distinctly convey positive and negative motivational signals. **Nature** 459: 838-842, 2009.

MCGEER, PL.; ITAGAKI, S.; AKIYAMA, H.; MCGEER, EG. Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. **Annals of Neurology** 24: 574-576, 1989.

MCNAMARA, R.K., LEVANT, B., TAYLOR, B., AHLBRAND, R., LIU, Y., SULLIVAN, J.R., STANFORD, K., RICHTAND, N.M. C57BL/6J mice exhibit reduced dopamine D3 receptor-mediated locomotor-inhibitory function relative to DBA/2J mice. **Neuroscience** 143: 141–153, 2006.

MHYRE, TR.; CHESLER, EJ.; THIRUCHELVAM, M.; LUNGU, C.; CORY-SLECHTA, DA.; FRY, JD.; RICHFIELD, EK. Heritability, correlations and in silico mapping of locomotor behavior and neurochemistry in inbred strains of mice. **Genes, Brain and Behavior** 4: 209–228, 2005.

MIKELL, CB; MCKHANN, GM; SEGAL, S; MCGOVERN, RA; WALLENSTEIN, MB; MOORE, H. The hippocampus and nucleus accumbens as potential therapeutic targets for neurosurgical intervention in schizophrenia. **Stereotactic and Functional Neurosurgery** v. 87, p. 256-265, 2009.

MINK JW.; THACH WT. Basal ganglia motor control, III: pallidal ablation: normal reaction time, muscle contraction, and slow movement. **Journal of Neurophysiology**. 65(2): 330-351, 1991.

MISSALE, C.; NASH, SR.; ROBINSON, SW.; JABER, M.; CARON, MG. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiological Reviews** 78: 189-225, 1998.

MIYOSHI, E.; WIETZIKOSKI, EC.; BORTOLANZA, M.; BOSCHEN, SL.; CANTERAS, NS.; IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C. Both the dorsal hippocampus and the dorsolateral striatum are needed for rat navigation in the Morris water maze. **Behaviour Brain Research** 226(1):171-8, 2012.

MONTMAYEUR, J.P.; BAUSERO. P.; AMLAIKY. N.; MAROTEAUX, L.; HEN, R.; BORRELLI E. Differential expression of the mouse dopamine receptor isoforms. **FEBS Lett** 278(2): 239-43, 1991.

NICOLA, SM. The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. **Psychopharmacology** 191: 521-550, 2007.

NIKOLAUS, S.; HAUTZEL, H.; MÜLLER, H.W. Neurochemical dysfunction in treated and nontreated schizophrenia – a retrospective analysis of in vivo imaging studies. **Reviews in the Neurosciences** 25(1): 25–9, 2014.

NIMITVILAI, S.; ARORA, S.; MCELVAIN, A.; BRODIE S. Reversal of inhibition of putative dopaminergic neurons of the ventral tegmental area: interaction of GABA_B and D2 receptors. **Neuroscience** 226:29–39, 2012.

NIMITVILAI, S.; BRODIE, MS. Reversal of Prolonged Dopamine Inhibition of Dopaminergic Neurons of the Ventral Tegmental Area. **J Pharmacology. Exp. Ther.** 333(2): 555-563, 2010.

NUSS, P.; HUMMER, M.; TESSIER, C. The use of amisulpride in the treatment of acute psychosis. **Therapeutics and Clinical Risk Management** 3(1): 3–11, 2007.

O'NEILL C, EVERS-DONNELLY A, NICHOLSON D, O'BOYLE KM, O'CONNOR JJ. D2 receptor-mediated inhibition of dopamine release in the rat striatum in vitro is modulated by CB1 receptors: Studies using fast cyclic voltammetry. **J Neurochem.** 108: 545–51, 2009.

OZAWA, K.; HASHIMOTO, K.; KISHIMOTO, T.; SHIMIZU, E.; ISHIKURA, H.; IYO, M. Immune activation during pregnancy in mice leads to dopaminergic hyperfunction and cognitive impairment in the offspring: a neurodevelopmental animal model of schizophrenia. **Biological Psychiatry** 59(6): 546-554, 2006.

PARENT, A.; HAZRATI LN. Functional-anatomy of the basal ganglia .1. The cortico-basal ganglia-thalamo-cortical loop. **Brain Research Reviews** 20(1): 91-127, 1995.

PAVLOV, PI. **Conditioned Reflexes**. London: Oxford Univ Press, 1927.

PERREAULT ML, GRAHAM D, BISNAIRE L, SIMMS J, HAYTON S, SZECHTMAN H Kappa-Opioid Agonist U69593 Potentiates Locomotor Sensitization to the D2/D3

Agonist Quinpirole: Pre- and Postsynaptic Mechanisms. **Neuropsychopharmacology** 31: 1967–1981, 2006.

PEUSKENS, J., LINK, C.G. A comparison of quetiapine and chlorpromazine in the treatment of schizophrenia. **Acta Psychiatr Scand.** 96(4): 265-273, 1997.

RAFFARD S.; ESPOSITO F.; BOULENGER JP.; VAN DER LINDEN M. Impaired ability to imagine future pleasant events is associated with apathy in schizophrenia. **Psychiatry Research** 209: 393–400, 2013.

RANKIN, ML.; HAZELWOOD, LA.; FREE, B.; NAMKUNG, Y.; REX, EB.; ROOF, RA.; SIBLEY, DR. Molecular pharmacology of the dopamine receptors. In: IVERSEN, L.L; IVERSEN, S.D; DUNNET, S.B, BJÖRKLUND, A. **Dopamine handbook**. Nova York: Oxford University Press, 2010. p. 540-557.

RASHID, AJ.; SO, CH.; KONG, MM.; FURTAK, T.; EL-GHUNDI, M.; CHENG, R.; O'DOWD, BF.; GEORGE SR. D1-D2 dopamine receptor heterooligomers with unique pharmacology are coupled to rapid activation of Gq/11 in the striatum. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 104(2): 654-9, 2007.

REDGRAVE P.; GURNEY K.; REYNOLDS J. What is reinforced by phasic dopamine signals? **Brain Research Reviews** 58: 322-339, 2008.

RODGERS, R.J., NIKULINA, E.M., COLE, J.C. Dopamine D1 and D2 receptor ligands modulate the behaviour of mice in the elevated plus-maze. **Pharmacol Biochem Behav.** 49(4): 985-95, 1994.

ROTH, BL.; ROGAN, S. Neuropharmacological profiles of antipsychotic drugs. In: IVERSEN, L.L; IVERSEN, S.D; DUNNET, S.B, BJÖRKLUND, A. **Dopamine handbook**. Nova York: Oxford University Press, 2010. p. 540-557.

SCHULTZ, W. Behavioral dopamine signals. **Trends in Neurosciences** 30: 203-210, 2007.

SEEMAN, MV.; SEEMAN, P. Is schizophrenia a dopamine supersensitivity psychotic reaction? **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 48: 155–160, 2014.

SEEMAN, P. Are dopamine D2 receptors out of control in psychosis? **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** 46:146–152, 2013.

SEEMAN, P. Targeting the dopamine D2 receptor in schizophrenia. **Expert Opin Ther Targets** 10:515–31, 2006.

SIMPSON, EH.; KELLENDONK, C.; KANDEL, E. A possible role for the striatum in the pathogenesis of the cognitive symptoms of schizophrenia. **Neuron** 65:585-596, 2010.

SINGER, P.; FELDON, J.; YEE, BK. Are DBA/2 mice associated with schizophrenia-like endophenotypes? A behavioural contrast with C57BL/6 mice. **Psychopharmacology** 206: 677–698, 2009.

SOKOLOFF P., GIROS B., MARTRES M., BOUTHENE M. AND SCHWARTZ J. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. **Nature** 347: 146–51, 1990.

SQUIRE, LR; KANDEL, ER. **Memória: da mente às moléculas**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

STAHL, SM. Psicose e esquizofrenia In: STAHL, SM. **Psicofarmacologia: bases neurocientíficas e aplicações práticas**. Rio de Janeiro: 3ªed Guanabara-Koogan, 2008. p. 168-217.

STARKE, K.; GOTHERT, M.; KILBINGER, H. Modulation of neurotransmitter release by presynaptic autoreceptors. **Physiological reviews** 69: 864-989, 1989.

STIP E. Cognition, schizophrenia and the effect of antipsychotics. **Encephale**. 32: 341-50, 2006.

SURMEIER DJ, SHEN W, DAY M, GERTLER T, CHAN S, TIAN X, PLOTKIN JL. The role of dopamine in modulating the structure and function of striatal circuits. **Progress in brain research**. 183: 149-67, 2010.

SURMEIER, DJ. Neuroscience: to go or not to go. **Nature** 494(7436): 178-9, 2013.

TREMBLAY, M., ROUILLARD, C., LEVESQUE, D. Dopamine D3 receptor antisense administration reduces basal c-fos and NGFI-B mRNA levels in the rat forebrain. **Synapse** 32: 51–57, 1999.

TYE, SJ.; MILLERA, AD.; BLAHA, CD. Ventral tegmental ionotropic glutamate receptor stimulation of nucleus accumbens tonic dopamine efflux blunts hindbrain-evoked phasic neurotransmission: Implications for dopamine dysregulation disorders. **Neuroscience** 252: 337–345, 2013.

USIELLO, A.; BAIK, J-H.; ROUGÉ-PONT, F.; PICETTI, R.; DIERICH, A.; LEMEUR, M.; PIAZZA, PV.; BORRELLI, E. Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors. **Nature** 408: 199-203, 2000.

VALLONE, D.; PICETTI, R.; BORRELLI, E. Structure and function of dopamine receptors. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews** 24: 125–132, 2000.

VAN REEKUM, R.; STUSS, DT.; OSTRANDER, L. Apathy: why care? **The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences** 17(1):7-19, 2005.

WADENBERG, M-L.; HICKS, PB. The conditioned avoidance response test re-evaluated: is it a sensitive test for the detection of potentially atypical antipsychotics? **Neuroscience and Behavioral Reviews** 23: 851-862, 1999.

WADENBERG, M-LG. Conditioned avoidance response in the development of new antipsychotics. **Current Pharmaceutical Design** 16: 358-370, 2010.

WADENBERG, MLG.; KAPUR, S.; SOLIMAN, A.; JONES, C.; VACCARINO, F. Dopamine d-2 receptor occupancy predicts catalepsy and the suppression of conditioned avoidance response behavior in rats. **Psychopharmacology** 150: 422-429, 2000.

WANG, Y., XU, R., SASAOKA, T., TONEGAWA, S., KUNG, M.P., SANKOORIKAL, E.B. DopamineD2 long receptor-deficient mice display alterations in striatum-dependent functions. **The Journal of Neuroscience** 20: 8305–8314, 2000.

WENDLER E, GASPAR JCC, FERREIRA TL BARBIERO JK.; ANDREATINI R., VITAL MA.; BLAHA CD.; WINN P.; DA CUNHA C. The roles of nucleus accumbens core, dorsomedial striatum and dorsolateral striatum in learning: performance and extinction of Pavlovian fear-conditioned responses and instrumental avoidance responses. **Neurobiology of Learning and Memory** 109:27-36, 2014.

WIETZIKOSKI, C E.C.; BOSCHEN, S.L., MIYOSHI, E. BORTOLANZA M, DOS SANTOS LM, FRANK M, BRANDÃO ML, WINN P, DA CUNHA C. Roles of D1-like dopamine receptors in the nucleus accumbens and dorsolateral striatum in conditioned avoidance responses. **Psychopharmacology** 219 (1) 159-69, 2012.

WU Y, BURANDA T, SIMONS PC, LOPEZ GP, MCINTIRE WE, GARRISON JC, et al. Rapid-mixflow cytometry measurements of subsecond regulation of G protein-coupled receptor ternary complex dynamics by guanine nucleotides. **Anal Biochem.** 371:10–20, 2007.

YIN, HH.; KNOWLTON, BJ.; BALLEINE, BW.; Inactivation of dorsolateral striatum enhances sensitivity to changes in the action-outcome contingency in instrumental conditioning. **Behavioural Brain Research** 166(2): 189-196, 2006.

YOUNG, JW.; LIGHT, GA.; MARSTON, HM.; SHARP, R.; GEYER, MA. The 5-choice continuous performance test: evidence for a translational test of vigilance for mice. **PLoS One** 4(1): e4227, 2009.

ZHANG, L; DOYON, WM; CLARK, JJ; PHILLIPS, PEM; DANI, JA. Controls of tonic and phasic dopamine transmission in the dorsal and ventral striatum. **Molecular Pharmacology** 76: 396-404, 2009.

ZHANG, H., SULZER, D. Regulation of striatal dopamine release by presynaptic auto- and heteroreceptors. **Basal Ganglia**. 2(1): 5–13, 2012.

ZHENG M., CHEONG S.Y., MIN C., JIN M., CHO D.I. AND KIM K.M. β -Arrestin2 plays permissive roles in the inhibitory activities of RGS9-2 on G protein-coupled receptors by maintaining RGS9-2 in the open conformation. **Molecular and Cellular Biology** 31:4887–4901, 2011.