



Università degli Studi di Cagliari

**DOTTORATO DI RICERCA
IN NEUROSCIENZE**

Ciclo XXIX

**EFFETTO DELL'INIBIZIONE DELLA 5-ALFA REDUTTASI
SULLE DISCINESIE IN UN MODELLO ANIMALE DI
MALATTIA DI PARKINSON**

Settore scientifico disciplinare di afferenza
BIO/14-Farmacologia

Presentata da:

Dott.ssa Silvia Fanni

Coordinatore Dottorato

Prof. Antonio Argiolas

Tutor

Dott.ssa Paola Devoto

Esame finale anno accademico 2015 – 2016
Tesi discussa nella sessione d'esame marzo – aprile 2017



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA IN NEUROSCIENZE

Ciclo XXIX

EFFETTO DELL'INIBIZIONE DELLA 5-ALFA REDUTTASI SULLE DISCINESIE IN UN MODELLO ANIMALE DI MALATTIA DI PARKINSON

Settore scientifico disciplinare di afferenza
BIO/14-Farmacologia

Presentata da:

Dott.ssa Silvia Fanni

Coordinatore Dottorato

Prof. Antonio Argiolas

Tutor

Dott.ssa Paola Devoto

Esame finale anno accademico 2015 – 2016
Tesi discussa nella sessione d'esame marzo – aprile 2017

INDICE

INTRODUZIONE	3
La malattia di Parkinson	3
Trattamento farmacologico e complicazioni	8
L-DOPA Induced Dyskinesia	12
Modello di lesione unilaterale con la 6-OHDA nel ratto	19
Dopamina e sistema dopaminergico.....	21
Steroidi neuroattivi	24
L'enzima 5-alfa reduttasi nella steroidogenesi cerebrale	25
Steroidi neuroattivi e dopamina	27
SCOPO DEL LAVORO	30
MATERIALI E METODI	31
Animali	31
Farmaci	31
Chirurgia stereotassica	32
Stepping test.....	32
AIMs	33
Immunistoichimica.....	34
Disegno sperimentale	35
Test dopo trattamento acuto	36
Test dopo trattamenti cronici	36
Post-trattamento.....	37
Trattamento preventivo	37
Co-somministrazione.....	37
Effetti sulle discinesie indotte da agonisti dopaminergici	38
Effetto della finasteride su LID nelle femmine	38
Studio comparativo	39
RISULTATI.....	40
Effetti del trattamento acuto	40
Effetti dei trattamenti cronici	40
Post-trattamento	40

Trattamento preventivo	41
Co-somministrazione.....	44
Effetti della finasteride sulle discinesie indotte da agonisti dopaminergici.....	46
Effetto della finasteride sulle discinesie nelle femmine.....	46
Studio comparativo	48
DISCUSSIONE	50
BIBLIOGRAFIA	56
RINGRAZIAMENTI	72
APPENDICE	73

INTRODUZIONE

La malattia di Parkinson

La malattia di Parkinson (MP) è una malattia neurologica, i cui sintomi cardine sono tremore a riposo, rigidità, bradicinesia e instabilità posturale.

Il primo a descrivere in modo dettagliato tale disturbo fu James Parkinson, medico, paleontologo e geologo britannico, nel 1817. Nella sua monografia intitolata *“An essay on the shaking palsy”* (Trattato sulla paralisi agitante), Parkinson descrisse con estrema accuratezza i segni clinici motori apparenti di sei individui che esibivano la tipica sintomatologia del disturbo della paralisi agitante. Nel suo trattato Parkinson definisce tale disturbo come: *“movimento involontario tremolante associato a una riduzione della forza muscolare, totale immobilità anche con la presenza di un sostegno; con una propensione a flettere il tronco in avanti, e passare da un’andatura normale ad una camminata a passo di corsa: il senno e l’intelletto rimangono indenni”* (J.Parkinson 1817).

Caratterizzata da una lenta degenerazione del sistema dopaminergico nigrostriatale, la MP è la seconda patologia neurodegenerativa più diffusa al mondo. La prevalenza della malattia è pari all’1-2% della popolazione sopra i 60 anni e al 3-5% sopra gli 85 anni. Questa patologia inizia a manifestarsi quando il processo neurodegenerativo è ormai a uno stadio avanzato. Infatti, i sintomi motori compaiono solo quando la degenerazione a carico delle cellule del sistema dopaminergico della *substantia nigra* colpisce il 60-80% della popolazione totale. Per tale motivo, la diagnosi non può mai essere precoce nel caso di questa malattia. La diagnosi tardiva fa sì che la terapia farmacologica

sia rivolta essenzialmente al ripristino delle funzionalità ormai perdute piuttosto che alla riparazione del danno.

Studi epidemiologici condotti in Europa e negli USA attestano che le persone di sesso maschile vengono colpite con una maggiore frequenza, circa 1.5-2% in più rispetto al sesso femminile (dal sito del Ministero della Salute).

Nella sua forma idiopatica, che si manifesta in circa il 90% dei casi, la patologia si presenta con disturbi del movimento, mentre disturbi non motori compaiono generalmente in fasi più avanzate della malattia. La comparsa di psicosi o disturbo del controllo degli impulsi sono eventi associati all'utilizzo di farmaci dopaminergici, mentre l'insorgenza di depressione o ansia non trovano una correlazione con l'utilizzo della terapia dopaminergica e potrebbero essere causati direttamente dalla degenerazione neuronale, oppure essere una conseguenza dello stato di disagio indotto dalla patologia.

La causa scatenante la malattia è ancora sconosciuta, tuttavia negli ultimi anni diversi ricercatori hanno rivolto la loro attenzione verso cause epigenetiche, attribuendo alla malattia un'origine multifattoriale, risultante dall'interazione tra fattori ambientali e predisposizione genetica. Nonostante l'età, il sesso e il processo di invecchiamento rappresentino i principali fattori associati all'insorgenza della malattia nella sua forma idiopatica, studi epidemiologici hanno evidenziato un aumento dell'incidenza della malattia con insorgenza precoce nelle popolazioni rurali (Rajput et al., 1986) dovuta a prolungate esposizioni a erbicidi come paraquat e rotenone (Hertzman et al., 1990; Semchuk et al., 1993; Gorell et al., 1998); mentre altre sostanze esogene come il fumo delle sigarette (Baron, 1986), la caffeina (Ross et al., 2000) e l'uso di

antiinfiammatori sembrano avere una correlazione negativa con l'insorgenza della malattia (Schapira&Jenner, 2011).

Per anni la teoria genetica è stata accantonata, il primo studio a correlare l'esordio precoce della malattia a fattori genetici ereditabili risale al 1997 (Polymeropoulos et al., 1997). Ad oggi, approssimativamente il 5% dei pazienti affetti da MP presenta chiaramente un'etiologia familiare caratterizzata da un pattern ereditario di tipo mendeliano (Hatano et al., 2009). Grazie alle recenti tecniche di *wide genome screening*, sono stati identificati circa 15 loci e 11 geni associati al rischio dell'insorgenza della malattia (Hatano et al., 2009; Coppedè, 2012). Tra questi, le mutazioni a carico del gene codificante per l' α -sinucleina, furono le prime alterazioni genetiche associate all'insorgenza della MP (Polymeropoulos et al., 1997; Riess et al., 1998).

Il differente grado di incidenza della MP in relazione al sesso ha portato diversi gruppi a condurre indagini più approfondite. In uno studio di coorte su 4.341 soggetti di età compresa tra 65 e 84 anni, Baldereschi e collaboratori hanno confermato la correlazione esistente tra una maggiore incidenza della MP, l'età e il sesso (Baldereschi et al., 2000). Infatti, in questo lavoro è stato dimostrato che il tasso di incidenza della malattia tende ad aumentare con l'età, inoltre gli uomini risultano maggiormente a rischio rispetto alle donne. Successivi studi hanno confermato questi dati attribuendo al sesso maschile un rischio relativo di 1.5 volte maggiore rispetto al sesso femminile (Wooten et al., 2004).

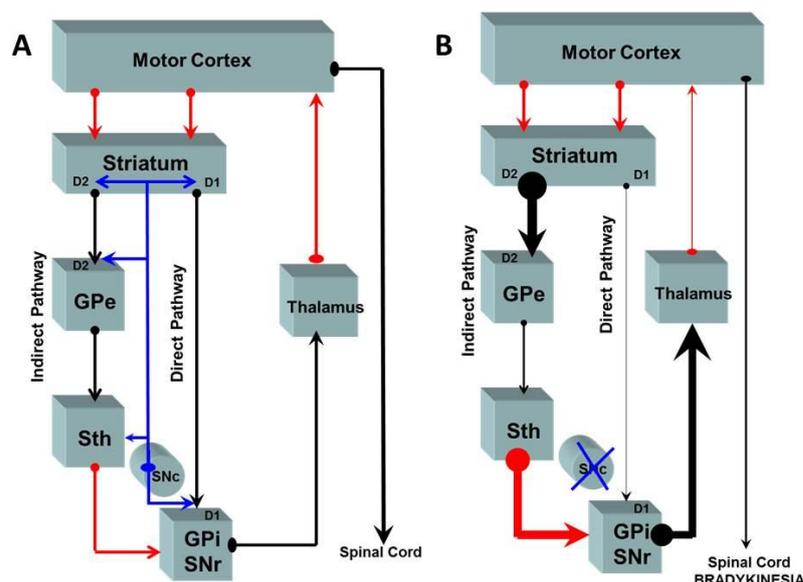
Tra le diverse ipotesi avanzate per spiegare le differenze nell'incidenza della malattia tra i due sessi, quella che attribuisce un ruolo neuroprotettivo agli estrogeni è la più accreditata (Disshon & Dluzen, 2000; Kenchappa et al., 2004;

Litim et al., 2016). Altre evidenze scientifiche collegano gli ormoni steroidei alla MP, infatti negli ultimi anni diversi studi hanno dimostrato l'importanza dei neurosteroidi nella modulazione del segnale dopaminergico, sistema fortemente compromesso nella fisiopatologia della malattia di Parkinson (Di Paolo, 1994; Sanchez et al., 2010).

La MP rappresenta la forma più frequente e meglio descritta di disordine del movimento. Dal punto di vista neurofisiologico, la sintomatologia motoria è una conseguenza delle alterazioni a carico del circuito motorio dei gangli della base, un gruppo di strutture sottocorticali ampiamente distribuite nel telencefalo, diencefalo e mesencefalo. Esse rappresentano un complesso circuito nervoso in grado di ricevere ed elaborare le informazioni provenienti da tutte le aree dalla corteccia cerebrale e ritrasmetterle attraverso il talamo, alle aree della corteccia motoria deputate alla pianificazione, elaborazione ed esecuzione dei movimenti. Le principali strutture dei gangli della base sono rappresentate dal nucleo caudato e dal putamen, che assieme al globo pallido interno (GPi) ed esterno (GPe) formano il corpo striato, dal nucleo subtalamico (STN), dalla substantia nigra parte compatta (SNpc) e la substantia nigra parte reticolata (SNpr). I neuroni dopaminergici che originano nella substantia nigra e proiettano nello striato costituiscono la *via nigrostriatale*, uno dei principali sistemi dopaminergici del sistema nervoso centrale, nonché il principale bersaglio del processo neurodegenerativo che porta all'insorgenza della MP. Nel circuito nigrostriatale possiamo distinguere tra una via diretta, deputata alla facilitazione del movimento, e una via indiretta, deputata all'inibizione del movimento. In condizioni fisiologiche, la dopamina viene rilasciata

abbondantemente nello striato dai neuroni afferenti dopaminergici nigrostriatali. Una volta liberata nello spazio extracellulare, la dopamina interagisce a livello post-sinaptico con i recettori dopaminergici D1 e D2 localizzati sui neuroni GABAergici efferenti, che formano rispettivamente la via striato-nigrale (via diretta) e striato-pallidale (via indiretta). In questo contesto la dopamina svolge un ruolo cruciale in quanto modulando positivamente o negativamente le due vie, regola i meccanismi di facilitazione e di inibizione del movimento volontario a livello di determinate aree corticali.

Nella MP, la carenza di dopamina a livello striatale, causata dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici, porta ad un disequilibrio dell'attività tra le due vie, con una predominanza della via indiretta su quella diretta. Tale condizione si riflette in un'azione inibitoria sull'esecuzione dei movimenti che conduce il paziente a una condizione di acinesia e rigidità motoria.



Rappresentazione schematica del circuito motorio dei gangli della base coinvolto nella MP: (A) condizione normale; (B) condizione parkinsoniana. GPe, globo pallido esterno; Sth, nucleo subtalamico; GPi, globo pallido interno; SNr, substantia nigra pars reticulata; SNc, substantia nigra pars compacta; D1, recettore dopaminergico D1; D2 recettore dopaminergico D2 (Tratta da Albarran Bravo et al., 2014).

Le principali manifestazioni cliniche che caratterizzano la MP, nonché criteri fondamentali per la diagnosi della malattia, sono comunemente note in gergo scientifico con l'acronimo **TRAP**: *Tremor at rest*, *Rigidity*, *Akinesia*, *Postural instability* (Calne et al., 1992; Gelb et al., 1999; Frank et al., 2006).

Il *tremore a riposo* è il sintomo di esordio nel 70% dei casi e compare in circa 2/3 dei soggetti affetti da MP (Hoehn et al., 1967; Rajput et al., 1991). Ha un'evoluzione indipendente dagli altri sintomi cardine della malattia, esordisce unilateralmente e interessa soprattutto gli arti superiori. Può successivamente coinvolgere anche altri distretti corporei come labbra e lingua. Tende a diminuire o scomparire con l'esecuzione di movimenti finalizzati.

La *rigidità* si presenta in circa il 90% dei pazienti. Come il tremore a riposo ha un esordio unilaterale, colpisce dapprima gli arti inferiori e poi quelli superiori, evolve quindi bilateralmente interessando collo e tronco. La comparsa di questo sintomo è una conseguenza dell'aumento del tono muscolare. Spesso è accompagnata da dolore della muscolatura interessata.

L'*acinesia* o *bradicinesia*, è presente in quasi tutti i pazienti affetti da MP (una percentuale compresa tra 80 e 100%). Il termine indica la difficoltà nell'iniziare un movimento volontario e lentezza nell'esecuzione del movimento stesso.

L'*instabilità posturale* è il risultato della perdita dei meccanismi di controllo della postura che causa una sensazione di instabilità e tendenza alla caduta. Questo sintomo generalmente compare nelle fasi più avanzate della malattia.

Trattamento farmacologico e complicazioni

Al giorno d'oggi, non è stata ancora trovata una cura in grado di contrastare la progressione della malattia, infatti, la terapia farmacologica utilizzata per questo

disturbo si limita al controllo della sintomatologia motoria. Nella pratica clinica si ricorre a diverse strategie terapeutiche che vedono la combinazione di diversi farmaci, perlopiù sostanze che hanno un ruolo chiave nei processi di sintesi e metabolismo della dopamina, con lo scopo di ripristinarne i livelli nigrostriatali. Tra queste, le più comuni mirano a:

- Aumentare i livelli di dopamina a livello centrale
- Stimolare in modo diretto i recettori dopaminergici
- Inibire il metabolismo della dopamina
- Favorire la liberazione di dopamina dai terminali pre-sinaptici

La terapia d'elezione è comunque rappresentata dall'uso di un precursore fisiologico della dopamina, la L-3,4 di-idrossifenilalanina (L-DOPA). La scelta dell'utilizzo di un precursore della dopamina piuttosto che la dopamina stessa, è dovuta all'incapacità del neurotrasmettitore di oltrepassare la barriera ematoencefalica a causa della sua struttura chimica. La L-DOPA invece, supera facilmente la barriera ematoencefalica, e una volta arrivata nel cervello, viene convertita in dopamina dall'enzima dopa-decarbossilasi. Al fine di inibire la decarbossilazione della dopamina nel torrente circolatorio, il farmaco viene dato in associazione con inibitori periferici della dopa-decarbossilasi, come la benserazide. In questo modo, elevate concentrazioni del farmaco giungono a livello centrale, limitando, inoltre, gli effetti collaterali periferici della dopamina (Emborg et al., 2007). L'introduzione della L-DOPA nella terapia della MP ha certamente migliorato la qualità e le aspettative di vita dei pazienti parkinsoniani. Tuttavia, il suo uso continuato risulta essere ben tollerato ed

efficace solo durante i primi anni di trattamento, periodo detto “*luna di miele*” (2-5 anni). Con il passare del tempo, l’efficacia della L-DOPA inizia a diminuire, lasciando spazio all’insorgenza degli effetti collaterali quali fluttuazioni motorie, discinesie, e complicanze non motorie come disturbi del sonno e disautonomie (Bastide et al., 2015). Le fluttuazioni motorie comprendono il fenomeno del *wearing-off* (effetto di fine dose) che indica l’inizio di una minor durata dell’effetto terapeutico della L-DOPA e le *fluttuazioni on-off* caratterizzate dall’alternanza di periodi durante i quali la mobilità del paziente tende ad aumentare (“tempo on” il paziente ha un pieno controllo del movimento) e periodi invece, caratterizzati da rigidità e acinesia (“tempo off” la L-DOPA perde la sua efficacia).

Le discinesie (note anche con l’acronimo LID, L-DOPA Induced Dyskinesia) invece, sono delle alterazioni del movimento caratterizzate dall’alternanza di movimenti ipercinetici e ipocinetici, che interessano le braccia, le mani, il tronco e la muscolatura oro-facciale. Esse rappresentano il più importante e invalidante effetto collaterale indotto dall’uso prolungato della L-DOPA. Possono presentarsi sotto forma di acinesia che precede il periodo di massima efficacia della L-DOPA, in questo caso si parla di *distonia del periodo off*, oppure possono essere associate ai periodi in cui i livelli plasmatici della L-DOPA aumentano e diminuiscono, in tal caso ci si riferisce alle *discinesie difasiche*; infine abbiamo le *discinesie di picco dose* che si manifestano quando i livelli plasmatici della L-DOPA raggiungono il plateau (Melamed, 1979; Luquin et al., 1992).

Tra gli agonisti dopaminergici, quelli maggiormente utilizzati sono i derivati ergolomici quali bromocriptina, cabergolina, lisuride e pergolide e i non ergolomici come il pramipexolo e il ropinirolo. Rispetto alla L-DOPA, gli agonisti dopaminergici, presentano una minore capacità di indurre la comparsa delle discinesie, per tale ragione, il loro utilizzo è spesso limitato nelle prime fasi della malattia, con lo scopo di posticipare quanto più possibile il ricorso alla L-DOPA e quindi la comparsa degli effetti collaterali dovuti al suo utilizzo prolungato. Tuttavia, i pazienti trattati con gli agonisti dopaminergici ai quali viene aggiunta successivamente la L-DOPA, tendono comunque a sviluppare i tipici movimenti involontari e anomali indotti dall'uso prolungato del precursore dopaminergico per eccellenza. Inoltre, gli agonisti dopaminergici diretti non sono altrettanto efficaci della L-DOPA nel contrastare la sintomatologia motoria.

Altri farmaci impiegati nelle prime fasi della malattia sono rappresentati dalla classe degli inibitori della MAO-B (selegilina e rasagilina) e inibitori delle COMT (entacapone e tolcapone). Queste sostanze agiscono interferendo con il catabolismo della dopamina. Ne consegue un accumulo del neurotrasmettitore a livello extracellulare che sopperisce al deficit causato dalla degenerazione dei neuroni dopaminergici. L'uso di tali sostanze è limitato alle prime fasi della malattia, quando la percentuale di neuroni dopaminergici integri è ancora significativa e quindi in grado di mantenere elevate le concentrazioni di dopamina endogena con il solo ausilio di questi inibitori.

L-DOPA Induced Dyskinesia

Le LID rappresentano, per i pazienti affetti da MP, la principale complicanza motoria causata dall'uso prolungato nel tempo di farmaci dotati di attività dopaminergica.

Le prime manifestazioni discinetiche vennero osservate da Cotzias e collaboratori nel 1967, quando per la prima volta testarono la L-DOPA su pazienti affetti da MP (Cotzias et al., 1967). Solo successivamente si scoprì che l'insorgenza delle discinesie poteva essere scatenata anche dall'utilizzo di altri farmaci dopamino-agonisti come per esempio l'apomorfina (Durif et al., 1994; Isacson et al., 1990).

Sebbene la causa scatenante le LID sia ancora sconosciuta, oggi possiamo affermare con certezza che la loro insorgenza è un evento associato a un processo di sensibilizzazione chiamato *priming*. Di fatto, la L-DOPA non è in grado di indurre le discinesie in pazienti parkinsoniani che non abbiano mai assunto un trattamento dopaminergico (Del Sorbo & Albanese 2008). Bensì, una stimolazione dopaminergica costante nel tempo, associata alle alterazioni neurochimiche indotte dalla denervazione a livello dello striato, rappresentano la condizione necessaria affinché successive somministrazioni di dopamino-agonisti inducano la comparsa delle discinesie (Jenner 2008). A conferma di quanto appena detto, recenti studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra LID e alterazioni delle attività neuronali dello striato quali: la produzione di cAMP, la fosforilazione di DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein 32 KDa), l'espressione di mRNA codificante per la dinorfina e per la GAD67 (glutamate acid decarboxylase 67 kDa) (Barone et al., 1994;

Carta et al., 2003). In questo scenario è stata inoltre documentata una eccessiva trasmissione dei recettori dopaminergici (Berthet and Bezard, 2009; Jenner 2008; Bastide et al., 2015), in particolare a livello della cascata del segnale D1 (Fiorentini et al., 2016; Aubert et al., 2005; Feyder et al., 2011; Westin et al., 2007).

Certamente nella MP il grado di degenerazione dopaminergica rappresenta il principale fattore di rischio associato all'insorgenza delle LID, conseguentemente, la conoscenza del decorso della patologia fornisce informazioni fondamentali nella scelta della strategia terapeutica da utilizzare. Infatti, come già detto, le prime manifestazioni discinetiche si manifestano dopo alcuni anni dall'inizio del trattamento, periodo che coincide con la perdita di una buona percentuale di neuroni dopaminergici. Allo stesso modo, modelli animali che presentano una lesione parziale necessitano di tempi di trattamento più lunghi affinché le LID si manifestino, contrariamente a quanto accade nei modelli di lesione completa. Questi dati confermano la correlazione esistente tra insorgenza delle LID e grado di lesione (Di Monte et al., 2000). In questa condizione patologica, un importante ruolo viene svolto dai terminali serotoninergici i quali condividono con il sistema dopaminergico l'apparato enzimatico responsabile della decarbossilazione della L-DOPA (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC) e il sistema di trasporto per la conservazione dei neurotrasmettitori in vescicole sinaptiche (vesicular monoamine transporter, *VMAT*).

Nel modello pre-sinaptico delle LID proposto da Carta e collaboratori (Carta et al., 2007) l'effetto terapeutico della L-DOPA viene mantenuto nel tempo finché è

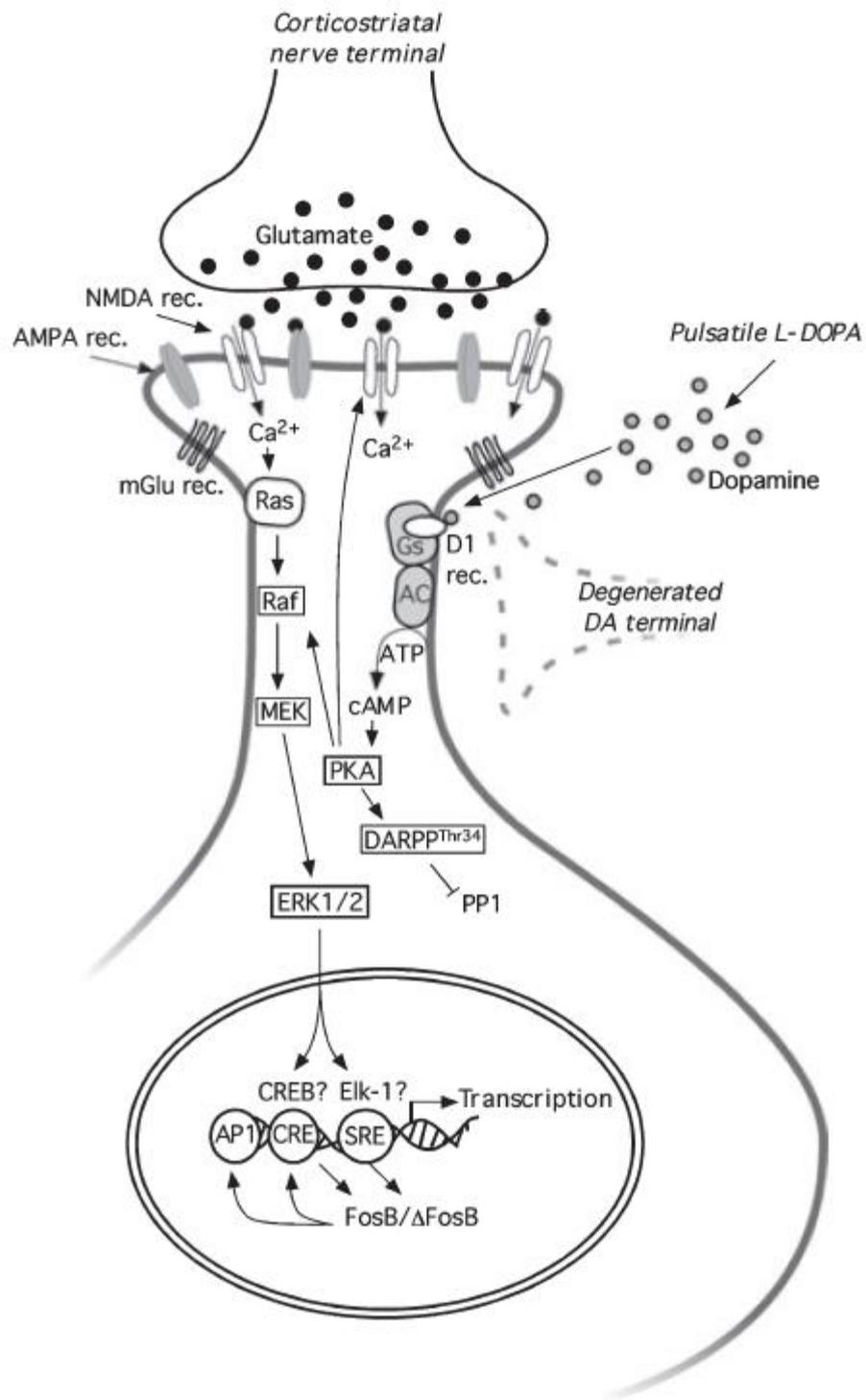
presente una quantità di terminazioni dopaminergiche in grado di mantenere costanti i livelli di dopamina provenienti dalle somministrazioni esogene di L-DOPA. In questo stadio della patologia, le fibre dopaminergiche sono ancora in grado di mantenere un livello fisiologico di dopamina striatale extracellulare grazie alla presenza di un meccanismo di controllo a feed-back fornito dalla presenza di autorecettori D2 e del trasportatore selettivo per la dopamina DAT (Dopamine Transporter). Con il progredire della malattia e quindi della degenerazione dopaminergica, entrano in gioco i neuroni serotoninergici i quali convertono la L-DOPA esogena in dopamina. Tuttavia, questa famiglia neuronale manca di un meccanismo di controllo a feed-back, ciò fa sì che la produzione e il rilascio di dopamina nello spazio sinaptico sia incontrollato e raggiunga livelli superiori rispetto a quelli fisiologici. La presenza di eccessive quantità di dopamina nello spazio sinaptico porta ad una iperstimolazione dei recettori dopaminergici localizzati nelle terminazioni post-sinaptiche inducendo così una risposta motoria anormale (Carta et al 2010), che si traduce nell'insorgenza delle discinesie. Il sistema serotoninergico appare quindi avere un ruolo cruciale nell'insorgenza delle LID. In accordo con quanto appena detto, Carta e collaboratori hanno dimostrato come la rimozione delle terminazioni serotoninergiche mediante l'infusione intraventricolare bilaterale di una neurotossina selettiva per il sistema serotoninergico, la 5,7-DHT (5,7-diidrossi triptamina), in un modello animale di MP, fosse in grado di ridurre in modo significativo il grado dei movimenti involontari anormali indotti dalla L-DOPA (Carta et al., 2007).

A livello post-sinaptico i principali processi che risultano alterati in associazione alla comparsa e severità delle LID, riguardano sostanzialmente quelli coinvolti nel segnale a cascata del recettore D1, nello specifico l'espressione del mRNA per la prodinorfina e i fattori di trascrizione per FosB/ Δ FosB (Cenci et al., 1998). In condizioni fisiologiche, la dopamina esercita un controllo di tipo inibitorio sulla via indiretta ed eccitatorio su quella diretta. Quindi nel modello di MP, la degenerazione dopaminergica si traduce in uno squilibrio tra le due vie a favore di quella indiretta, come dimostrato dalla misurazione dei livelli dei precursori della dinorfina ed encefalina (Gerfen et al., 1990) che si localizzano rispettivamente con i recettori D1 della via diretta e D2 della via indiretta. L'eccessiva stimolazione dei recettori dopaminergici dovuta all'utilizzo della L-DOPA porta a una riduzione dell'attività della via indiretta a favore invece di quella diretta che si traduce nell'insorgenza dei movimenti involontari anormali. Inoltre, analisi post mortem di modelli animali di MP hanno chiaramente dimostrato che lo sviluppo delle LID era accompagnato da un aumento della densità dei recettori D1 striatali. Questo evento era accompagnato a sua volta da un aumento dell'espressione del secondo messaggero e quindi alterazioni del "*trafficking*" recettoriale (Guigoni et al., 2007). Di contro, non è stata misurata nessuna alterazione consistente nei livelli dei D2. Tali evidenze confermano ancora una volta che i recettori D1 giocano un ruolo chiave nell'espressione delle discinesie.

In questo contesto, la terapia dopaminergica di uso comune per contrastare la sintomatologia motoria della MP, porta anche se indirettamente, all'aumento dei livelli del secondo messaggero cAMP che a sua volta attiva la PKA. Nella sua

forma attiva la PKA può fosforilare DARPP-32 la quale a sua volta si comporta da inibitore selettivo per la proteina fosfatasi-1 (PP-1). Ne consegue il blocco della defosforilazione di diversi target coinvolti nel segnale a cascata della PKA, promuovendo ulteriormente la sua azione. Diversi studi hanno dimostrato che la fosforilazione di DARPP-32 mediata dalla PKA è un evento fortemente implicato nelle discinesie (Picconi et al., 2003) ed esercitato soprattutto a livello della via diretta striatale dei *Medium Spiny Neurons* che esprimono recettori D1 (Santini et al., 2012). A conferma di ciò recenti studi hanno dimostrato che iniezioni intrastriali dell'inibitore per la PKA, Rp-Camps, riducono notevolmente le discinesie in ratti lesionati con 6-OHDA (Label et al., 2010).

L'attivazione dei secondi messaggeri calcio e cAMP, dovuta alla stimolazione dei recettori del glutammato e D1, si riflette nella fosforilazione e quindi attivazione striatale delle ERK1 e 2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase), che agiscono promuovendo l'espressione di diversi fattori di trascrizione nucleari tra i quali Δ FosB. Westin e collaboratori hanno dimostrato la presenza di una correlazione positiva tra i livelli striatali di ERK nella forma fosforilata (e quindi attiva) e la gravità dei movimenti involontari anormali indotti dalla L-DOPA in ratti lesionati con 6-OHDA (Westin et al., 2007). Sempre nello stesso lavoro, è stato dimostrato il coinvolgimento dei recettori D1 nell'attivazione striatale del segnale ERK indotta dalla L-DOPA. Infatti, l'uso di un antagonista selettivo per il recettore D1, SCH23390, ha completamente bloccato l'attivazione della cascata ERK e la conseguente sovra-espressione di FosB/ Δ FosB in animali trattati con L-DOPA. L'utilizzo dell'antagonista selettivo per il recettore D2, raclopride, non ha esercitato alcun effetto sulla risposta indotta dalla L-DOPA.



Rappresentazione schematica dei meccanismi post-sinaptici implicati nelle LID. (Tratta da Cenci & Lundblad al., 2006)

Sulla base dei meccanismi pre- e post-sinaptici coinvolti nell'insorgenza e sviluppo delle discinesie, sono state proposte diverse strategie terapeutiche per contrastare l'insorgenza degli effetti collaterali causati dall'uso prolungato con la L-DOPA. Diversi approcci mirano al miglioramento della farmacocinetica e della via di somministrazione del farmaco d'elezione, sono state infatti proposte nuove formulazioni in grado di mantenere stabili i livelli di L-DOPA nel sangue; per esempio l'infusione a livello duodenale di una preparazione gelificata del farmaco si è mostrata molto efficace nel ridurre le fluttuazioni motorie (Nyholm et al., 2005).

Visto il coinvolgimento del sistema serotoninergico nell'insorgenza delle LID, sono state sperimentate anche molecole in grado di interagire con questo sistema a livello presinaptico, per esempio l'agonista del recettore 5-HT_{1A} buspirone fu il primo a essere utilizzato su pazienti affetti da MP (Kleedorfer et al., 1991). In un recente studio è stato dimostrato che il buspirone è in grado di ridurre il rilascio di DA a livello striatale in seguito alla somministrazione di L-DOPA. Conseguentemente è stata notata anche una riduzione delle LID. L'uso in combinazione di eltoprazina e anpirtolina, agonisti dei recettori 5-HT_{1A/1B}, in modelli animali di MP ha portato a una completa abolizione delle LID, sebbene associata ad una riduzione dell'effetto terapeutico della L-DOPA (Bezard et al., 2013).

Meno successo è stato riscontrato nelle formulazioni che hanno come bersaglio i recettori NMDA. Tralasciando l'amantadina che si è rivelata efficace nella riduzione delle LID (Blanchet et al., 1998), altri antagonisti dei recettori NMDA come remacemide e milacemide (Clarke et al., 2001; Giuffra et al., 1993;

Merello et al., 1999) non hanno mostrato lo stesso potere antidiscinetico. Questi dati fanno pensare che il potere antidiscinetico esibito dall'amantadina potrebbe essere il risultato della sua interazione con altri tipi recettoriali che non appartengano alla classe NMDA (Bastide et al., 2015).

Modello di lesione unilaterale con la 6-OHDA nel ratto

A differenza di tante altre patologie, la MP non si manifesta spontaneamente negli animali, per questo motivo, affinché tale disturbo possa essere studiato, si è reso indispensabile riprodurre, attraverso manipolazioni farmacologiche e genetiche, la sua fisiopatologia. Nello specifico, i modelli animali farmacologici sono ottenuti tramite la somministrazione di reserpina, aloperidolo o colino mimetici o indotti attraverso neurotossine (quali la 6-idrossidopamina [6-OHDA], la 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina [MPTP], il rotenone ed il paraquat); i modelli genetici riproducono la malattia attraverso l'iperespressione o la delezione di geni direttamente interessati nella sua patogenesi.

I nostri studi sono stati condotti su un modello di MP indotto dalla 6-OHDA, l'analogo idrossilato della dopamina, in grado di provocare la morte dei neuroni dopaminergici. La sua affinità strutturale con la dopamina le permette di legarsi ai trasportatori delle monoamine (DAT, NAT e SERT) ed essere quindi trasportata all'interno dei neuroni dopaminergici, noradrenergici e, in misura minore, serotoninergici. Il suo effetto neurotossico si esplica con la produzione di radicali liberi che vanno ad interferire con l'attività degli enzimi respiratori mitocondriali (complessi I e IV) causando così la morte cellulare (Glinka et al., 1997; Mazziò et al., 2004). Vista la sua incapacità di oltrepassare la barriera ematoencefalica, la 6-OHDA viene infusa stereotassicamente all'interno di

specifiche aree del cervello, lungo la via nigrostriatale, a seconda del tipo di lesione che si vuole ottenere. Un'infusione della tossina diretta verso lo striato provoca una lesione parziale; se si vuole ottenere una degenerazione anterograda dell'intero sistema dopaminergico nigrostriatale, la lesione deve essere eseguita direttamente nella substantia nigra. Il sito di iniezione oggi maggiormente utilizzato è rappresentato dal fascio mediale del proencefalo (MFB), nel quale confluiscono la maggior parte delle fibre dopaminergiche nigrostriatali; questo tipo di lesione comporta una totale e irreversibile degenerazione dei neuroni dopaminergici con una riduzione fino al 100% dei livelli di dopamina nello striato (Winkler et al., 2002). Tuttavia, questa lesione deve essere necessariamente unilaterale, per evitare l'eccessivo deficit motorio ed elevata mortalità che verrebbe prodotta da una lesione bilaterale.

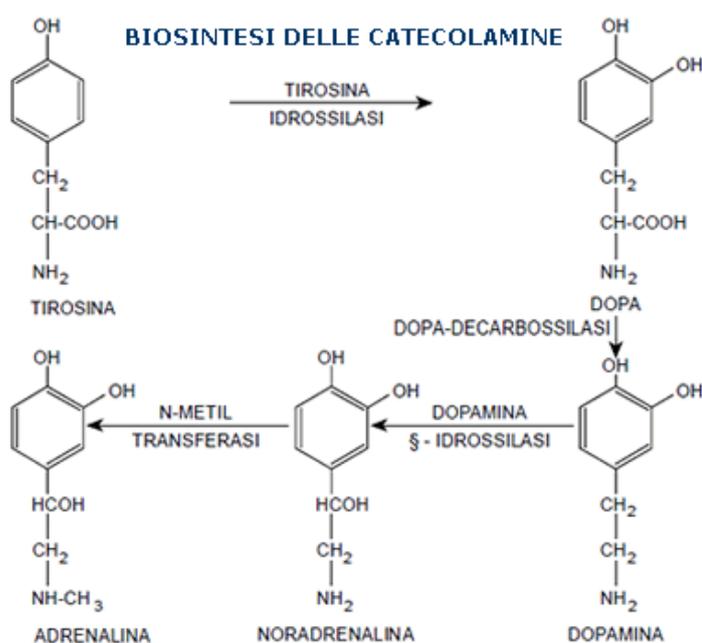
Questo modello sperimentale per lo studio della MP, si presta alla misurazione di diversi comportamenti motori espressi diversamente dal lato del corpo controlaterale alla lesione, che risulta deficitario, e dal lato ipsilaterale intatto, che funge da controllo interno. Le valutazioni motorie eseguite con il test del cilindro (Lundblad et al., 2002), il *rotarod test* (Lundblad et al., 2003) e lo *stepping test* (Kirik et al., 2001; Bezard et al., 2013; Tronci et al., 2013) ci consentono di ottenere utili informazioni sia riguardo il grado di lesione, che sugli effetti terapeutici indotti dalla L-DOPA o dalla sua combinazione con altri farmaci dotati di potenzialità terapeutica.

Inoltre, nei roditori lesionati con 6-OHDA, ripetute somministrazioni di L-DOPA a basse dosi (di solito 6-12 mg/kg in associazione con inibitori della decarbossilasi periferica), sono causa dell'insorgenza di movimenti anormali

involontari (AIMs). Questi movimenti riproducono le discinesie di picco-dose osservate nei pazienti discinetici e sono stati classificati in una scala oggi utilizzata da tutto il mondo scientifico per la valutazione delle discinesie nel modello animale di lesione da 6-OHDA (Cenci et al., 1998; Lundblad et al., 2002).

Dopamina e sistema dopaminergico

La dopamina è un neurotrasmettitore endogeno appartenente alla famiglia delle catecolamine. La sua sintesi avviene nel citosol dei neuroni dopaminergici del sistema nervoso centrale, a partire dall'aminoacido tirosina, convertito nell'intermedio L-diidrossifenilalanina (L-DOPA) dall'enzima tirosina idrossilasi. A questo punto, sempre nel citosol, avviene la trasformazione della L-DOPA in dopamina, ad opera della DOPA-decarbossilasi, un enzima che agisce eliminando dalla L-DOPA un gruppo carbossilico.



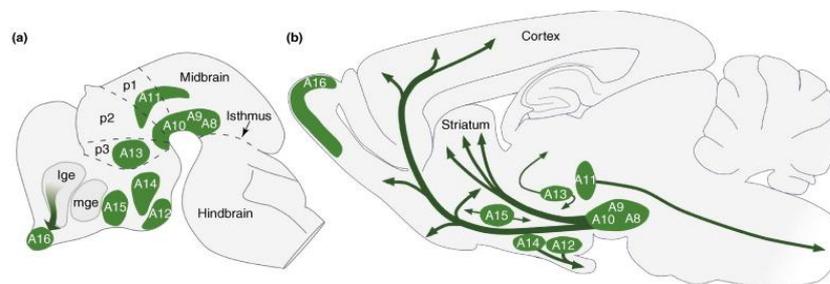
A livello delle terminazioni nervose, la dopamina viene immagazzinata all'interno di vescicole sinaptiche principalmente attraverso un processo di trasporto attivo mediato dal VMAT2 (*Vesicular Monoamine Transporter 2*). Il trasferimento della dopamina all'interno di queste vescicole di deposito ha lo scopo di immagazzinare il neurotrasmettitore, ma soprattutto di proteggerlo dall'azione delle MAO. Il rilascio della dopamina nello spazio sinaptico è un evento mediato da un processo di esocitosi Ca^{2+} dipendente. La dopamina così rilasciata nello spazio sinaptico può andare in contro a diversi destini:

- Può interagire con i recettori dopaminergici postsinaptici ed esplicare così la sua azione, oppure legarsi agli autorecettori presinaptici inibendo la sintesi e il rilascio di altro neurotrasmettitore nel vallo sinaptico.
- Può essere metabolizzata dalle MAO e COMT presenti nel vallo sinaptico. La degradazione della dopamina operata da questi due enzimi porta alla formazione rispettivamente di acido 3,4-diidrossifenilacetico (DOPAC) e acido 3-metossi-4-idrossifenilacetico (HVA).
- La dopamina può venire ricaptata dalla cellula presinaptica attraverso il trasportatore specifico di membrana DAT (*Dopamine Transporter*) e conservata all'intero delle vescicole sinaptiche.

L'attività della dopamina nel cervello, è mediata dalla sua interazione con i recettori dopaminergici. Esistono cinque tipi di recettori dopaminergici raggruppati in due grandi classi, sulla base di alcune proprietà strutturali e farmacologiche in comune, i D1-like e i D2-like. In generale, sono tutti dei recettori metabotropici accoppiati a proteine G. Appartengono alla famiglia D1-

like i recettori D1 e D5. Strutturalmente sono caratterizzati dall'aver una lunga catena C-terminale intracellulare, mentre dal punto di vista farmacologico, agiscono stimolando la formazione di AMP ciclico e l'idrolisi di fosfatidilinositolo. I recettori D2, D3 e D4 appartengono alla classe dei D2-like. Essi sono accomunati dall'aver un'ansa intracellulare molto lunga, inoltre agiscono riducendo la formazione di AMP ciclico che si riflette in un'azione inibitoria dovuta all'iperpolarizzazione della membrana causata dall'apertura dei canali al K^+ e chiusura dei canali Ca^{2+} .

A livello centrale, secondo la classica nomenclatura introdotta da Dahlström e Fuxe (1964) e la nuova organizzazione topografica basata sulle più recenti tecniche di immunistochemica e marcatura retrograda o anterograda, i neuroni dopaminergici sono distribuiti in 9 distinti distretti cellulari, denominati A8-A16 (Björklund and Dunnett, 2007) .



Recente organizzazione topografica dei neuroni di proiezione dopaminergica nel cervello in via di sviluppo (a) e adulto (b) (Tratta da Björklund and Dunnett, Trends in Neuroscience, 2007).

I corpi cellulari dei neuroni della via nigrostriatale (A9) hanno sede nella SNpc del mesencefalo, e proiettano nel corpo striato (Fuxe et al., 1985). Questo sistema fa parte del sistema extrapiramidale deputato al controllo del tono muscolare, del movimento e della coordinazione motoria. È caratterizzato da un'elevata densità di recettori D1 a livello delle sinapsi nigrostriatali e tra striato

e globo pallido interno, mentre i recettori D2 sono presenti come recettori presinaptici nei neuroni dopaminergici della SNpc e nei neuroni striato-pallido mediali.

Steroidi neuroattivi

Il termine “neurosteroidi” venne introdotto per la prima volta nel 1981 dal fisiologo francese Étienne-Émile Baulieu. Nel suo lavoro “*Steroid Hormone Regulation of the Brain*”, Baulieu, propose un’iniziale distinzione tra neurosteroidi prodotti *de novo* nel cervello e steroidi neuroattivi, cioè ormoni steroidei secreti dai classici organi steroidogenici (gonadi, placenta e surrene), i quali attraverso il torrente circolatorio, vengono trasportati nel sistema nervoso centrale dove esplicano la loro azione. La scoperta che portò Baulieu a fare tale considerazione, riguardava i livelli dell’ormone steroideo DHEA (deidroepiandrosterone) nel cervello di ratti sottoposti a gonadectomia e/o adrenalectomia. Egli scoprì infatti che questo ormone persisteva nei tessuti cerebrali anche dopo l’asportazione delle ghiandole surrenali, i principali organi deputati alla sua produzione. Negli ultimi anni, diversi gruppi hanno replicato gli esperimenti di Baulieu per verificare se effettivamente gli steroidi venissero prodotti *de novo* nel cervello o se semplicemente essi venissero prodotti in periferia per poi essere trasportati e quindi accumulati a livello centrale. I risultati stabilirono, in modo inequivocabile, che gli stessi enzimi implicati nella produzione degli ormoni steroidei nelle ghiandole periferiche, erano presenti anche in diverse aree del cervello (Compagnone & Mellon 2000).

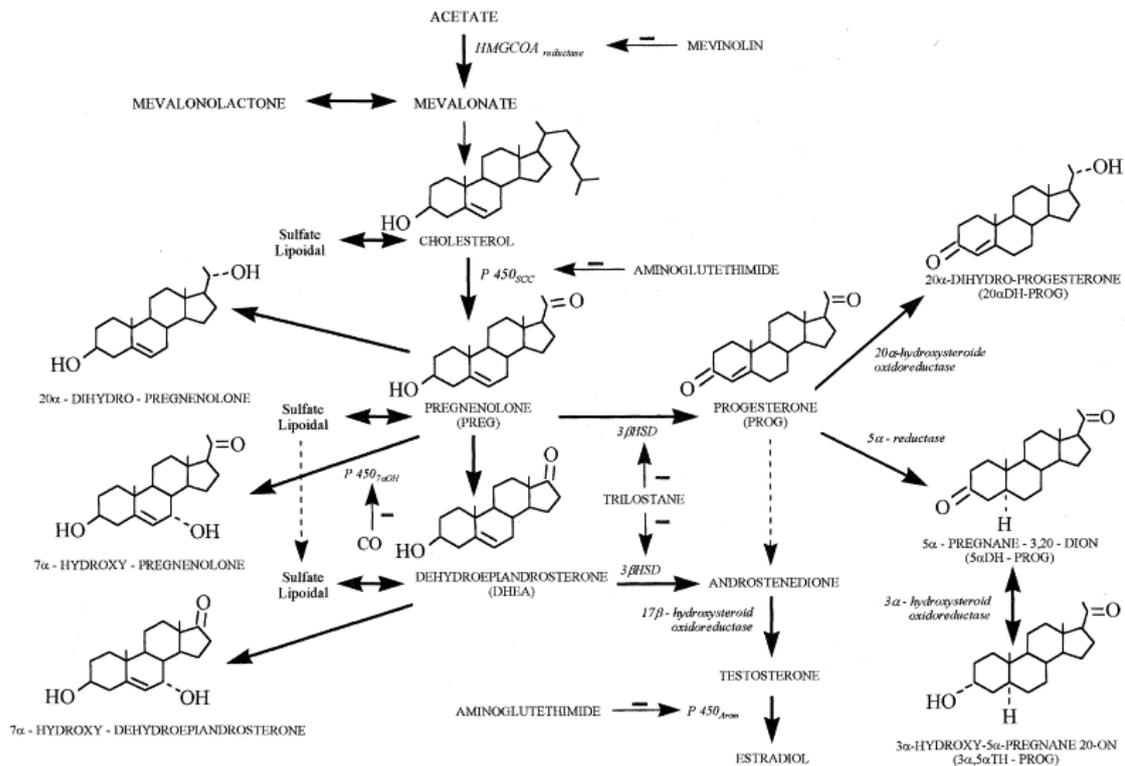
La scoperta della biosintesi di steroidi cerebrali ha portato diversi gruppi a indagare i meccanismi d’azione attraverso i quali agiscono questi

neuromodulatori del sistema nervoso centrale. A differenza del “classico” meccanismo genomico attuato degli ormoni steroidei, attraverso il legame e l’attivazione di recettori intracellulari e trascrizione di specifici geni (Yamamoto, 1985), i neurosteroidi sono in grado di regolare l’eccitabilità neuronale ed il rilascio di neurotrasmettitori con una cinetica più rapida dovuta all’attivazione di recettori di membrana (Majewska et al., 1986; Paul & Purdy, 1992; Reddy, 2010). In particolare, diversi studi hanno dimostrato l’interessamento dei neurosteroidi nella regolazione di diversi sistemi neurotrasmettitoriali implicati nella patofisiologia e nel trattamento di diversi disturbi del sistema nervoso centrale, incluso quello dopaminergico (Sánchez et al., 2010).

L’enzima 5-alfa reduttasi nella steroidogenesi cerebrale

Come già detto precedentemente, gli steroidi neuroattivi sono steroidi che regolano le attività neuronali e le funzioni fisiologiche del SNC. Essi appartengono alla classe di steroidi endogeni prodotti dal tessuto nervoso.

In generale, gli steroidi endogeni, che siano prodotti dagli organi steroidogenici o dal cervello, presentano tutti un precursore comune, il colesterolo, il quale attraverso diverse reazioni catalizzate dal complesso enzimatico citocromo P450 *scc* (*side-chain cleavage*) viene convertito nei suoi metaboliti attivi (Plassart-Schiess & Baulieu, 2001).

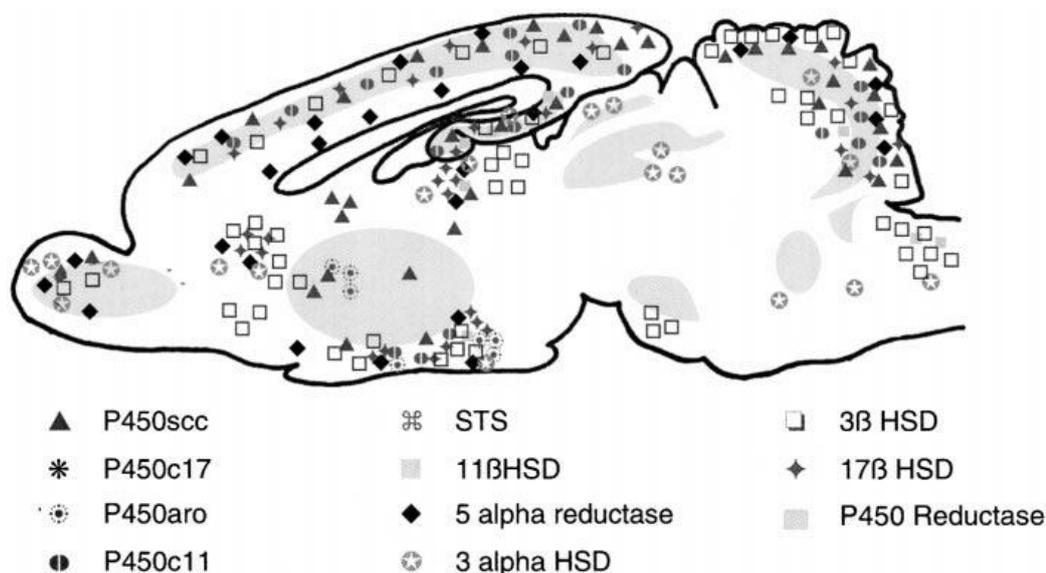


Biosintesi e metabolismo di neurosteroidi (Tratta da Plassart-Schiess and Baulieu, 2001)

Un ruolo cruciale nella via biosintetica dei neurosteroidi è ricoperto dalla 3-ossi-5alfa-steroide-4-deidrogenasi, nota anche come 5 alfa-reduttasi (5AR), un enzima appartenente alla classe delle ossidoreduttasi responsabile di una delle due principali vie biosintetiche della steroidogenesi cerebrale. Infatti la 5AR converte i precursori chetosteroidi (come i progestinici, gli androgeni e i glucorticoidi) nei loro metaboliti 5-alfa ridotti (Martini et al., 1993, 1996).

Sono state identificate due principali isoforme della 5AR, che si differenziano per selettività verso i substrati, cinetiche di attivazione e distribuzione nei vari tessuti dell'organismo.

Nei roditori, la 5AR di tipo 1 è costantemente presente attraverso tutti gli stadi dello sviluppo, mentre l'espressione della 5AR2 nell'adulto è principalmente modulata dal segnale androgenico (Poletti et al., 1998; Torres & Ortega, 2003).



Distribuzione degli enzimi coinvolti nella neurosteroidogenesi nel cervello di ratto adulto (Tratta da Compagnone & Mellon 2000)

Le differenti localizzazioni e profili biochimici che contraddistinguono le due isoforme potrebbero farci pensare a differenti ruoli fisiologici. In realtà, nonostante queste differenze, apparentemente le due isoforme promuovono le stesse reazioni. I due principali processi catalizzati dalla 5AR sono rappresentati dalla conversione del progesterone in allopregnanolone e del testosterone in diidrottestosterone. Questi rappresentano dei passaggi fondamentali nei meccanismi di regolazione rispettivamente dello stress (Khisti et al., 2002; Rupprecht et al., 1999) e delle fluttuazioni androgeniche cerebrali (Breedlove, 1992).

Steroidi neuroattivi e dopamina

Il ruolo dei neurosteroidi nella modulazione del sistema dopaminergico e quindi il loro coinvolgimento nell'insorgenza di patologie caratterizzate da un'alterazione di tale sistema è stato ampiamente studiato (Di Paolo, 1994). In particolare, diversi studi preclinici e clinici hanno indicato il coinvolgimento dei

neurosteroidi nella fisiopatologia della MP. Per esempio, studi clinici ed epidemiologici hanno chiaramente dimostrato effetti protettivi degli estrogeni sia in modelli animali che in pazienti affetti da MP (Litim et al., 2016; Labandeira-Garcia J et al., 2016). Infatti, la somministrazione di estrogeno attenua la perdita dei neuroni dopaminergici nella substantia nigra e la neurotossicità indotta da aminoacidi eccitatori (Yi et al., 2016). Studi epidemiologici hanno indicato che il prolungato uso di contraccettivi orali (<10 anni) è associato a un rischio minore di contrarre questa patologia, mentre donne in menopausa hanno un rischio più elevato (Liu et al., 2014). Inoltre, è stato recentemente riportato che il blocco della 5AR, che porta a un accumulo di estrogeno, produce effetti positivi nel modello di Parkinson murino dell'MPTP (Litim et al., 2015, 2016).

In aggiunta alle proprietà protettive degli steroidi neuroattivi sul sistema dopaminergico, negli ultimi anni il nostro gruppo ha scoperto che la modulazione farmacologica di questi steroidi cerebrali normalizza significativamente una serie di alterazioni comportamentali indotte dalla somministrazione di agonisti dopaminergici diretti e indiretti. Nello specifico, abbiamo dimostrato che nei roditori l'inibizione della 5AR, attraverso la somministrazione di inibitori, quali finasteride e dutasteride, migliora l'iperattività, i comportamenti stereotipati e deficit dell'inibizione da pre-stimolo, o *pre-pulse inhibition del riflesso di startle* (PPI) indotta dall'agonista dopaminergico selettivo D1 (Bortolato et al., 2008; Frau et al., 2016; Frau et al., 2013). Inoltre, è importante sottolineare che tali effetti antidopaminergici, sono mediati da una modulazione negativa del recettore D1 post-sinaptica nello

striato e non sono accompagnati da manifestazioni extrapiramidali (Devoto et al 2012). Infine, recentemente abbiamo dimostrato che, parallelamente all'azione della finasteride nel contrastare le alterazioni comportamentali mediate dal D1, questo farmaco ha efficacemente normalizzato anche i deficit della PPI prodotti dall'agonista selettivo D3 (Mosher et al., 2016).

SCOPO DEL LAVORO

Sulla base delle ultime scoperte che vedono un forte coinvolgimento dei neurosteroidi nella modulazione del segnale dopaminergico, degli effetti antidopaminergici degli inibitori della 5AR attraverso la modulazione D1 e D3, e visto il ruolo predominante di tali recettori nell'insorgenza e patogenesi delle LID, lo scopo di questo studio è stato quello di investigare se la 5AR potesse avere un ruolo nella fisiopatologia di questo disturbo motorio.

Nello specifico, abbiamo testato l'impatto degli inibitori della 5AR, finasteride e dutasteride, sull'espressione e sviluppo delle discinesie indotte dalla L-DOPA e dagli agonisti dopaminergici in ratti emiparkinsoniani, lesionati con 6-OHDA. Inoltre, abbiamo studiato se il blocco della 5AR potesse migliorare o interferire con le proprietà terapeutiche della L-DOPA nelle performance motorie dei ratti emiparkinsoniani.

MATERIALI E METODI

Animali

Per lo svolgimento di questo studio sperimentale sono stati utilizzati ratti, maschi e femmine del ceppo Sprague-Dawley (Envigo, San Pietro al Natisone, Udine, Italia), di peso compreso tra i 275 e i 300 g. Gli animali sono stati stabulati in numero di 4 per gabbia, in condizioni di temperatura pari a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidità del 60% e sottoposti ad un ciclo di luce/buio artificiale di 12/12 ore. Acqua e cibo sono stati resi disponibili *ad libitum*. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in accordo con quanto indicato nel D.L. 26/2014 e nelle direttive del Consiglio Europeo 63/2010.

Farmaci

Per questo studio sono stati utilizzati i seguenti farmaci: L-3,4-diidrossifenilalanina (L-DOPA) (Research Organics-USA), benserazide (Sigma-Aldrich), apomorfina (Tocris Bioscience-UK) e ropinirolo (Sigma Aldrich) disciolti in soluzione fisiologica allo 0.9% di NaCl e somministrati per via sottocutanea (s.c.); SKF82958 (cloro-APB) disciolto in acqua distillata e iniettato s.c.; finasteride (FIN) e dutasteride (DUTA) (Carbosynth Limited-UK) sospesi in un veicolo costituito da una soluzione di tween80 al 5% in salina sterile, sono stati iniettati per via intraperitoneale (i.p.) con un volume di iniezione pari a 2 ml/kg. La 6-OHDA (Sigma Aldrich) è stata disciolta in una soluzione sterile di salina contenente acido ascorbico (0.1%, v/v).

Chirurgia stereotassica

Dopo una settimana di acclimazione nelle stanze di stabulazione, gli animali sono stati sottoposti a un intervento di chirurgia stereotassica. Le lesioni sono state eseguite utilizzando un apparecchio stereotassico (David Kopf Instruments, CA) dotato di una siringa Hamilton da 5 μ l. Una miscela costituita da Fentanest (Pfizer) e Dormitor® (Orion Pharma) 20:1 è stata iniettata i.p. in un volume pari a 1.6 ml per animale in modo da indurre anestesia generale. Al fine di proteggere il sistema serotoninergico dall'azione della neurotossina, tutti gli animali hanno ricevuto una iniezione i.p. di citalopram 2.5 mg/kg, venti minuti prima dell'anestesia. Successivamente, gli animali hanno ricevuto una singola infusione di 6-OHDA nel fascio mediale del proencefalo (MFB) dell'emisfero destro, al fine di ottenere una completa lesione della via nigrostriatale. Sono state seguite le seguenti coordinate: AP, - 2.2 mm; ML, - 1.5 mm; DV, - 7.8 mm dalla dura madre (Paxinos and Watson, 1998). Ogni animale ha ricevuto 4 μ l di 6-OHDA pari a 16 μ g di base libera, con una velocità di infusione pari a 1 μ l/min. Al termine dell'intervento chirurgico, gli animali sono stati risvegliati con un'iniezione s.c. di Antisedan® (Orion Pharma) al dosaggio di 0.37 mg/kg.

Stepping test

A tre settimane dalla lesione con 6-OHDA, gli animali sono stati sottoposti allo stepping test. Questo test ha lo scopo di valutare l'entità della lesione attraverso il corrispettivo *impairment* motorio delle zampe anteriori dell'animale e, in base alle risposte motorie, di distribuire gli animali in gruppi sperimentali bilanciati. La *performance* dell'animale deve essere valutata dopo un periodo di *training* e manipolazione, solitamente tre giorni sono sufficienti affinché l'animale

acquisisca una certa familiarità con il test. Durante l'esperimento, sull'animale viene eseguita una presa tale da lasciare libera solo una zampa anteriore, la quale sarà oggetto di valutazione. L'animale viene quindi condotto dall'operatore a percorrere con una sola zampa per volta, un piano orizzontale lungo 90 cm in 5 secondi. Tale operazione viene eseguita sia per la zampa anteriore destra sia per quella sinistra. L'esperimento viene ripetuto due volte e per la determinazione dei gruppi sperimentali viene considerata la media dei passi (*adjusting steps*) che l'animale riesce ad eseguire con ogni zampa e per ogni direzione (Tronci et al., 2013).

AIMs

La valutazione dei movimenti anormali involontari (*Abnormal Involuntary Movements*, AIMs) è stata eseguita sulla base della scala per la valutazione delle discinesie nel ratto (Lundblad et al., 2002; Tronci et al. 2014). Gli animali vengono alloggiati singolarmente in gabbie trasparenti sprovviste di acqua, cibo e *bedding* per tutto il tempo necessario alla durata del test (dai 140 ai 160 minuti). Ogni animale viene visionato per 60 secondi, a intervalli di 20 minuti, durante i quali si valuta la gravità dell'evento discinetico indotto dal farmaco. In accordo con la loro distribuzione topografica, gli AIMs sono classificati come: *limb* (movimenti anormali e involontari della zampa anteriore e delle dita controlaterali alla lesione), *orolingual* (movimenti della mascella e protrusioni controlaterali alla lesione della lingua) e *axial* (postura distonica o rotazione coreiforme del collo e della parte superiore del corpo lungo il lato controlaterale alla lesione). Per ognuno di questi sottogruppi, viene assegnato un punteggio compreso tra 0 e 4 sulla base della durata dell'evento (0 non presente; 1

presente per un arco di tempo compreso tra 1 e 29 secondi; 2 presente per più di 30 secondi; 3 presente per 60 secondi e interrotto a seguito di uno stimolo acustico; 4 presente per 60 secondi ma non interrotto a seguito di uno stimolo acustico).

Immunoistochimica

Al fine di valutare la bontà della lesione, al termine dei test comportamentali gli animali sono stati sacrificati 24 ore dopo l'ultimo trattamento e parte dell'encefalo (striato e sostanza nera parte compatta) è stato processato per la quantificazione della tirosina idrossilasi (marker dei neuroni dopaminergici) mediante la tecnica dell'immunoistochimica. In questo studio sono stati selezionati solo i ratti che alla colorazione immunoistochimica hanno mostrato una deplezione del sistema nigrostriatale superiore al 90%.



Immagine rappresentativa della tecnica immunoistochimica per la tirosina idrossilasi in sezioni coronali rappresentanti lo striato (a sinistra) e la sostanza nera (a destra) di un ratto lesionato unilateralmente con 6-OHDA. L'assenza di colorazione nell'emisfero destro è una conferma della mancanza dell'enzima tirosina idrossilasi e quindi della lesione avvenuta correttamente.

Disegno sperimentale

Nella prima serie di esperimenti abbiamo testato gli effetti acuti della FIN sulle discinesie indotte da L-DOPA in ratti maschi lesionati con 6-OHDA. Successivamente, al fine di valutare il potenziale terapeutico del farmaco, lo abbiamo somministrato a gruppi diversi di animali in tre differenti regimi di trattamento. Nello specifico, gli animali lesionati con 6-OHDA sono stati sottoposti a: trattamento preventivo (la FIN è stata somministrata come agente preventivo per l'insorgenza delle discinesie in animali naïve, prima dell'inizio del trattamento con L-DOPA); co-somministrazione (i trattamenti con FIN e L-DOPA sono iniziati contemporaneamente) e post-trattamento (gli animali sono stati trattati con FIN solo dopo l'insorgenza delle LID).

Il secondo set di esperimenti è stato invece indirizzato al fine di discriminare quale recettore dopaminergico potesse essere coinvolto nel meccanismo d'azione della FIN. Abbiamo quindi studiato gli effetti dell'inibitore della 5AR sulle discinesie indotte da diversi agonisti dopaminergici quali apomorfina (agonista D1-D2), Cloro-APB (agonista selettivo per il recettore D1) e ropinirolo (agonista D2-D3).

Le differenze esistenti tra i generi femminile e maschile nella modulazione della 5AR da parte degli androgeni (Sanchez et al., 2006), ci hanno spinto a studiare gli effetti della FIN anche in ratti femmine. Abbiamo quindi voluto vedere se la FIN data cronicamente, avesse le stesse proprietà antidiscinetiche manifestate nel genere maschile. Inoltre, anche in questo caso abbiamo voluto testare

l'azione della FIN sulle discinesie indotte da diversi agonisti dopaminergici. Come per i maschi, abbiamo utilizzato l'apomorfina, il Cloro-APB e il ropinirolo. Infine, considerato il largo utilizzo negli ultimi anni della DUTA nel trattamento dell'iperplasia prostatica benigna, abbiamo deciso di allestire uno studio comparativo tra la FIN e la DUTA, due farmaci caratterizzati dall'avere lo stesso target, ma differenti affinità. Infatti, mentre la FIN è un inibitore selettivo dell'isoforma di tipo II della 5AR, la DUTA inibisce indistintamente entrambe le isoforme. Abbiamo quindi studiato l'influenza che questi farmaci hanno sull'insorgenza delle discinesie attraverso la valutazione degli AIMs, e sull'effetto terapeutico della L-DOPA mediante il test dello stepping.

Test dopo trattamento acuto

Tre settimane dopo la lesione con la 6-OHDA, gli animali sono stati trattati giornalmente per i successivi 21 giorni con L-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg s.c.) al fine di renderli discinetici. Gli animali che hanno sviluppato le discinesie sono stati distribuiti in 3 gruppi ben bilanciati sulla base dei valori medi degli AIMs, quindi sottoposti a trattamento acuto con FIN (30 o 60 mg/kg i.p.) o Veh (sal/tween80) 40 minuti prima dell'iniezione con L-DOPA. La risposta alla singola iniezione è stata valutata con il test degli AIMs.

Test dopo trattamenti cronici

Lo studio degli effetti della somministrazione cronica di FIN è stato suddiviso in tre fasi caratterizzate da differenti regimi di trattamento. Sostanzialmente, i tre set sperimentali differiscono nelle dinamiche tempistiche dei trattamenti con la FIN rispetto al trattamento con L-DOPA. In tutti i protocolli utilizzati durante

questo studio, l'inibitore della 5AR viene somministrato sempre 40 minuti prima della terapia dopaminergica.

Post-trattamento

Tre settimane dopo la lesione unilaterale con la 6-OHDA gli animali sono stati trattati cronicamente (3 settimane) con L-DOPA/benserazide (6 mg/kg s.c.), al fine di ottenere un'espressione stabile delle discinesie. Sulla base della media dei punteggi ottenuti durante la valutazione degli AIMS, gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi bilanciati e trattati per i successivi 25 giorni con L-DOPA/benserazide in combinazione con FIN (30 o 60 mg/kg i.p.) o Veh (sal/tween80). La risposta degli animali al trattamento cronico è stata monitorata con la valutazione degli AIMS due volte a settimana per tutta la durata del trattamento.

Trattamento preventivo

Gli animali lesionati sono stati suddivisi in 3 gruppi bilanciati sulla base dei punteggi ottenuti con lo *stepping test*, quindi trattati preventivamente con FIN (30 e 60 mg/kg i.p.) o Veh (sal/tween80) per le tre settimane antecedenti l'inizio del trattamento con L-DOPA/benserazide (6 mg/kg s.c.). Per i successivi 25 giorni, gli animali hanno ricevuto un'iniezione di L-DOPA/benserazide 40 minuti dopo l'iniezione giornaliera di FIN o Veh. La valutazione degli AIMS è stata eseguita ogni 3-4 giorni per tutta la durata del trattamento, con lo scopo di monitorare la comparsa, nonché l'andamento delle discinesie.

Co-somministrazione

Come per il trattamento preventivo, gli animali sono stati suddivisi in 3 gruppi sperimentali ben bilanciati sulla base dei valori ottenuti con lo *stepping test*.

Durante questo studio, gli animali hanno ricevuto lo stesso trattamento descritto precedentemente, con l'unica differenza che la terapia dopaminergica e il trattamento con la FIN o Veh sono iniziati lo stesso giorno. Anche in questo caso l'andamento delle discinesie è stato monitorato con valutazioni periodiche degli AIMS.

Effetti sulle discinesie indotte da agonisti dopaminergici

Tre settimane dopo la lesione unilaterale con la 6-OHDA gli animali sono stati trattati con L-DOPA/benserazide fino alla comparsa delle discinesie (almeno 3 settimane). Il giorno del test, gli animali sono stati divisi in gruppi e trattati con diversi agonisti dopaminergici quali apomorfina (0.1 mg/kg s.c.); ropinirolo (0.2 mg/kg s.c.); Cloro-APB (0.1 mg/kg s.c.), più FIN (60 mg/kg i.p.) o Veh (sal/tween80), 40 minuti prima del trattamento con l'agonista dopaminergico. È stato quindi valutato il potenziale antidiscinetico della FIN con il test degli AIMS.

Effetto della finasteride su LID nelle femmine

L'effetto dell'inibizione della 5AR sulle discinesie è stato studiato anche in ratti femmine lesionati con 6-OHDA. Anche in questo caso è stato mantenuto lo stesso protocollo utilizzato per i maschi. In un primo set di esperimenti abbiamo studiato l'effetto di una somministrazione acuta di FIN alle dosi di 30 e 60 mg/kg su discinesie già conclamate indotte da L-DOPA. Abbiamo voluto quindi approfondire il nostro studio proseguendo con un trattamento cronico. Successivamente, per distinguere quale *pathway* recettoriale fosse implicato nella risposta antidiscinetica della FIN abbiamo testato il farmaco su animali

trattati acutamente con diversi agonisti dopaminergici, come già discusso per i maschi.

Studio comparativo

Gli animali lesionati con 6-OHDA sono stati suddivisi in 5 gruppi ben bilanciati sulla base del numero dei passi eseguiti durante lo *stepping test*, e trattati preventivamente per 2 settimane con DUTA (15 e 30 mg/kg i.p.), FIN (30 e 60 mg/kg i.p) o Veh (sal/tween80). Dopo 15 giorni di trattamento preventivo con i due inibitori della 5AR, è stato introdotto il trattamento cronico con L-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg s.c.) con le stesse modalità descritte precedentemente. La valutazione degli AIMS è stata eseguita ogni 3-4 giorni, mentre lo stepping test è stato eseguito al primo e al 23° giorno di trattamento con L-DOPA.

RISULTATI

Effetti del trattamento acuto

In figura 1 sono mostrati gli effetti del trattamento acuto con FIN 30 e FIN 60 in ratti maschi discinetici (n=16-17 per gruppo). L'analisi statistica ha chiaramente dimostrato che iniezioni acute di FIN sono in grado di ridurre in modo dose dipendente le manifestazioni discinetiche indotte da L-DOPA [$F_{(2, 47)} = 17.19$, $p < 0.0001$]. L'analisi post-hoc ha confermato che la dose di FIN 60 è la più efficace (Veh+LD vs FIN60+LD, $P < 0.0001$; test di Tukey).

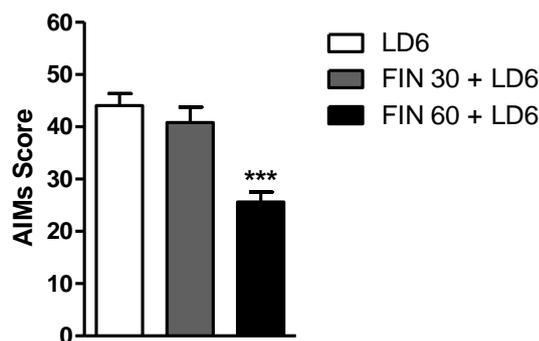


Fig.1 Effetto acuto della FIN su discinesie già conclamate. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. Tukey's test *** $p < 0.001$ vs LD6

Effetti dei trattamenti cronici

Post-trattamento

Sulla base dei dati ottenuti dal test preliminare in acuto, altri animali lesionati con 6-OHDA e resi discinetici con L-DOPA sono stati trattati cronicamente con le due dosi di FIN testate in acuto (n=10 per gruppo). In accordo con i risultati precedentemente ottenuti, il trattamento cronico con FIN 30 e FIN 60, ha portato ad una riduzione significativa delle LID in modo dose dipendente. Nello specifico, FIN 60 si è mostrata efficace sin dalla prima somministrazione e

l'effetto si è mantenuto per tutta la durata del trattamento, mentre l'effetto antidiscinetico della dose di 30 mg/kg è stato significativo solo dopo due settimane di trattamento. L'analisi statistica ANOVA a due vie per misure ripetute ha rilevato un significativo effetto del tempo [$F_{(7, 189)} = 13.34$, $P < 0.0001$], del trattamento [$F_{(2, 27)} = 10.77$, $P < 0.001$] e una interazione tempo x trattamento [$F_{(14, 189)} = 2.893$, $P < 0.001$]. L'analisi dei confronti multipli eseguita con il test di Tukey ha confermato che la dose più alta è stata in grado di attenuare notevolmente le manifestazioni discinetiche già dalla prima somministrazione, mentre la dose più bassa è risultata efficace solo dopo somministrazioni ripetute (Fig. 2).

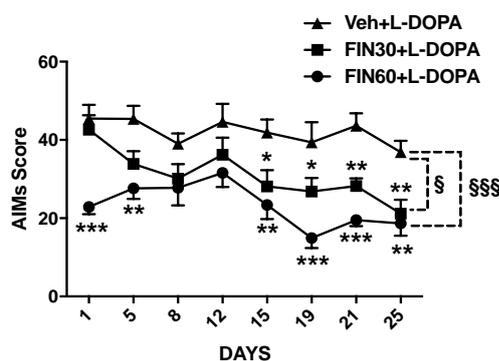


Fig.2 Andamento temporale degli AIMs durante il trattamento cronico con FIN 30 e FIN 60. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. § $p < 0.05$, §§§ $p < 0.001$ vs Veh+L-DOPA; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ vs i corrispondenti tempi del gruppo Veh+LD (Tukey's test).

Trattamento preventivo

Con lo scopo di riprodurre una situazione clinica molto frequente, un gruppo di animali è stato trattato preventivamente con l'inibitore della 5AR, prima dell'inizio del trattamento con L-DOPA. La figura 3 mostra l'andamento temporale degli AIMs indotti da L-DOPA durante un trattamento iniziato

precedentemente con FIN 30, FIN 60 o Veh, in ratti lesionati con 6-OHDA (n=8-9 per gruppo).

Dal grafico si evince chiaramente una riduzione significativa nell'insorgenza e nello sviluppo delle discinesie negli animali trattati preventivamente con le due dosi di FIN. Inoltre, tale effetto protettivo si è mantenuto per tutta la durata del trattamento. L'analisi statistica ANOVA a due vie per misure ripetute mostra un effetto significativo del trattamento [$F_{(2, 23)} = 10.69$] e del tempo [$F_{(7, 161)} = 5.762$]. Il test di Tukey ha confermato che entrambe le dosi di FIN hanno portato ad una riduzione significativa degli AIMs in tutti i tempi considerati (Fig. 3).

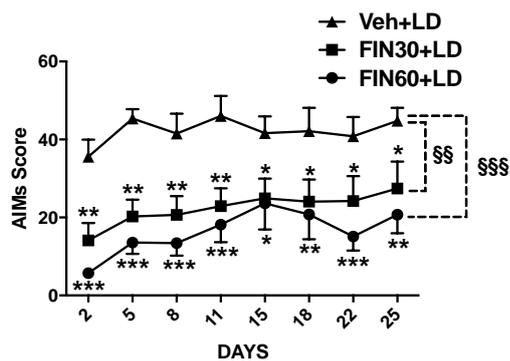


Fig.3 Andamento temporale degli AIMs indotti da L-DOPA in animali trattati preventivamente con FIN 30 e FIN 60. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. §§ p<0.001, §§§ p<0.0001 vs Veh+LD; *** p < 0.001; ** p < 0.01; *p<0.05 vs i corrispondenti tempi del gruppo Veh+LD (Tukey's test).

La riduzione significativa nell'insorgenza delle discinesie associata al trattamento preventivo è accompagnata da una leggera diminuzione a fine trattamento dell'attività antidiscinetica della FIN. Nonostante questo leggero calo dell'attività del farmaco, come si può notare nella figura 4 (che mette in relazione l'andamento temporale degli AIMs all'ultimo giorno di somministrazione), le dosi di FIN risultano essere ancora efficaci. In particolare, l'analisi statistica ANOVA a due vie per misure ripetute mostra per la FIN 60 un

effetto significativo del trattamento [$F(2, 23) = 5.157$] e del tempo [$F(7, 161) = 59.62$] e una interazione tempo x trattamento [$F(14, 161) = 3.111$]. L'analisi post-hoc eseguita con il Bonferroni post-test, conferma il mantenimento dell'effetto discinetico della FIN 60 e, anche se in minor misura, per la FIN 30.

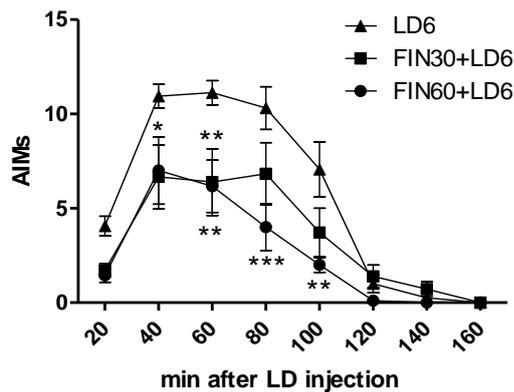


Fig.4 Andamento temporale degli AIMs indotti da L-DOPA relativi al giorno 25 in animali trattati preventivamente con FIN 30 e FIN 60. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ vs i corrispondenti tempi del gruppo LD6 (Bonferroni post test).

In figura 5 abbiamo voluto mettere a confronto gli andamenti temporali degli AIMs relativi al secondo e ultimo giorno di somministrazione con L-DOPA. L'analisi statistica ANOVA a due vie per misure ripetute mostra per la FIN 30 un effetto significativo del tempo [$F(7, 112) = 16.53$], mentre per FIN 60 indica un effetto significativo del trattamento [$F(1, 16) = 9.418$] e del tempo [$F(7, 112) = 13.91$] e una interazione tempo x trattamento [$F(7, 112) = 9.423$]. L'analisi delle comparazioni multiple eseguita con il Bonferroni post-test conferma una diminuzione dell'effetto antidiscinetico della FIN 60 al 25° giorno rispetto al secondo. Questo andamento è comunque in linea con i dati degli AIMs cumulativi che mostrano una leggera riduzione dell'azione antidiscinetica a fine trattamento, ma comunque significativa rispetto al gruppo di controllo.

Verosimilmente questo effetto è il risultato di una probabile tolleranza al farmaco da parte degli animali dovuta all' esposizione prolungata di FIN.

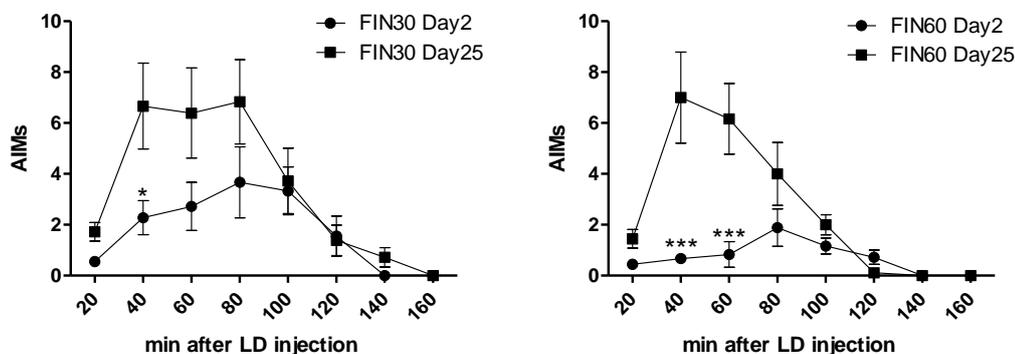


Fig.5 Andamento temporale degli AIMs indotti da L-DOPA relativi ai giorni 2 e 25 in animali trattati preventivamente con FIN 30 e FIN 60. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. *** p < 0.001; *p<0.05 vs i corrispondenti tempi del gruppo Day 25 (Bonferroni post test).

Co-somministrazione

L'insorgenza e lo sviluppo delle discinesie in regime di co-somministrazione è rappresentato in figura 6. In questo set sperimentale, come è accaduto per il trattamento preventivo, gli animali che hanno ricevuto L-DOPA+Veh si differenziano nettamente dai due gruppi trattati con L-DOPA+FIN 30 e L-DOPA+FIN 60 (n= 8-9 ratti per gruppo). Anche nella co-somministrazione con la L-DOPA, l'inibizione della 5AR sembra limitare la gravità degli eventi discinetici. Questo dato è confermato dall'analisi statistica ANOVA a due vie, che ha rivelato un effetto del tempo [$F_{(7, 147)} = 11.18$] e del trattamento [$F_{(2, 21)} = 4.075$]. L'analisi post hoc eseguita con il test di Newman-Keuls ha rilevato un effetto significativo della FIN a entrambe le dosi (P<0.05); in particolare FIN 60 ha esibito un effetto antidiscinetico più marcato l'ultimo giorno di trattamento rispetto al dosaggio di 30 mg/kg.

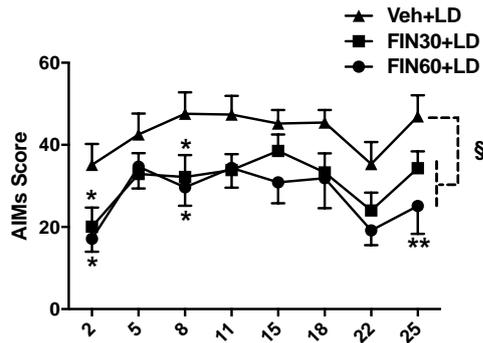


Fig.6 Andamento temporale degli AIMs durante co-somministrazione di L-DOPA più FIN 30 o FIN 60. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. § $p < 0.05$ vs Veh+LD; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs i corrispondenti tempi del gruppo Veh+LD (Newman-Keuls test).

In figura 7, dal confronto dell'andamento temporale degli AIMs tra il secondo giorno di co-somministrazione e l'ultimo, è facile notare una differenza tra le due dosi di FIN. Infatti, mentre la FIN 60 sembra aver mantenuto lo stesso potere antidiscinetico, l'azione esercitata dalla dose di 30 mg/kg tende a diminuire l'ultimo giorno di somministrazione. L'ANOVA a due vie per misure ripetute ha rilevato, per FIN 60, un effetto del tempo [$F_{(7, 98)} = 16.62$], mentre per FIN 30 ha indicato un effetto del tempo [$F_{(7, 98)} = 40.09$] e del trattamento [$F_{(1, 14)} = 5.254$] e un'interazione tempo x trattamento [$F_{(7, 98)} = 8.763$].

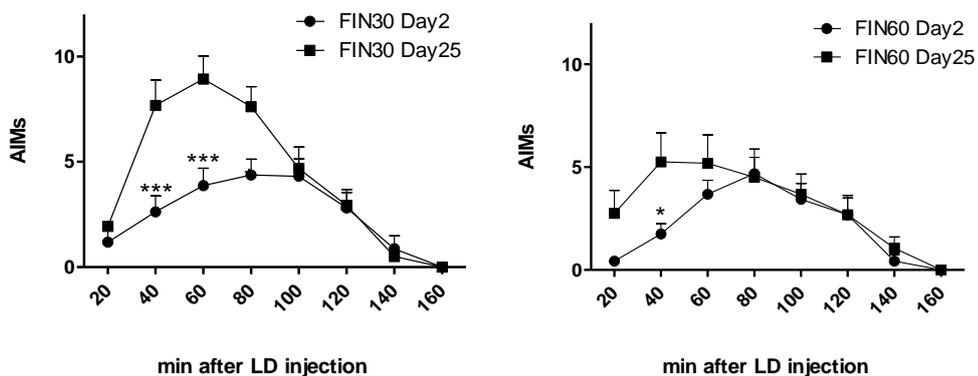


Fig.7 Andamento temporale degli AIMs indotti da L-DOPA relativi ai giorni 2 e 25 in animali trattati con FIN 30 e FIN 60 in regime di co-somministrazione. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. *** $p < 0.001$; * $p < 0.05$ vs i corrispondenti tempi del gruppo Day 25 (Bonferroni post test).

Effetti della finasteride sulle discinesie indotte da agonisti dopaminergici

Al fine di investigare sul meccanismo antidiscinetico della FIN abbiamo testato la dose efficace di 60 mg/kg in animali, precedentemente resi discinetici con L-DOPA, nei quali, il giorno del test le discinesie sono state scatenate dal trattamento con diversi agonisti dopaminergici. Come è possibile evincere dalla figura 8, la FIN ha attenuato notevolmente le discinesie indotte da apomorfina (n=5 ratti per gruppo), Cloro-APB (n=10 per gruppo) e ropinirolo (n=8 per gruppo) in ratti emiparkinsoniani. L'analisi statistica (test del t di Student a due code) ha confermato un effetto significativo della FIN sull'apomorfina (t = 3.299, P < 0.05), Cloro-APB (t = 7.201, P < 0.001) e ropinirolo (t = 4.365, P < 0.001).

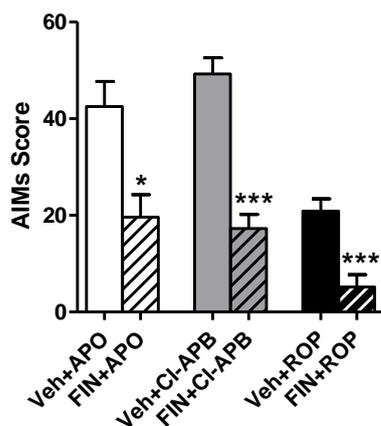


Fig.8 Effetto della finasteride (FIN 60 mg/kg) in ratti discinetici trattati con agonisti dopaminergici. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. Unpaired, two-tailed t test *** p < 0.001, *p<0.05 .

Effetto della finasteride sulle discinesie nelle femmine

Un ulteriore set di esperimenti è stato allestito con lo scopo di valutare gli effetti della FIN sulle discinesie in ratte femmine lesionate con 6-OHDA. Il trattamento in cronico ha confermato la capacità della FIN (30 e 60 mg/kg) di ridurre in modo significativo le discinesie indotte da L-DOPA (n=7 per gruppo). L'analisi statistica ha confermato un effetto del trattamento [$F_{(2,18)} = 8.442$] e una

tendenza per l'interazione tempo x trattamento (P=0.1). In accordo, l'analisi post-hoc eseguita con il test di Tukey, ha confermato la capacità della FIN 60 di ridurre in modo significativo le discinesie indotte da L-DOPA (Fig.8).

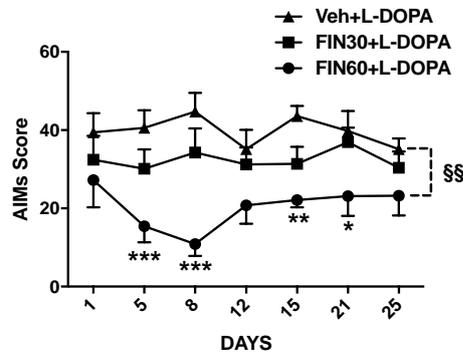


Fig.9 Andamento temporale degli AIMs durante il trattamento cronico con FIN 30 o FIN 60 più L-DOPA (6 mg/kg) in ratti femmine. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. §§ p<0.001 vs Veh+L-DOPA; *** p < 0.001; ** p < 0.01; *p<0.05 vs i corrispondenti tempi del gruppo Veh+L-DOPA (Tukey's test).

Come è accaduto per i maschi, anche nelle femmine la FIN ha attenuato notevolmente le discinesie indotte da diversi agonisti dopaminergici quali apomorfina (n=10 per gruppo), Cloro-APB (n=8 per gruppo) e ropinirolo (n=7 per gruppo). Come evidenziato nella figura 10, l'analisi statistica ha confermato un effetto significativo della FIN sull'apomorfina (t = 8.626, P < 0.001), Cloro-APB (t = 8.932, P < 0.001) e ropinirolo (t = 2.321, P < 0.05).

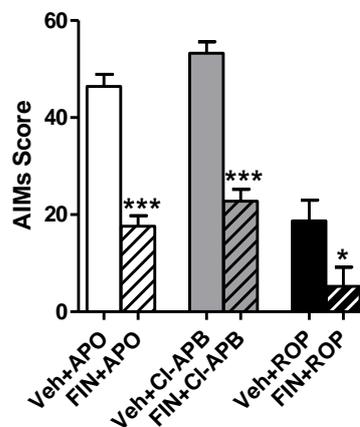


Fig.10 AIMs (media \pm SEM) in seguito a trattamento acuto con FIN 60 mg/kg in ratte discinetiche trattate con agonisti dopaminergici. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. Unpaired, two-tailed t test *** p < 0.001, *p<0.05 .

Studio comparativo

Come mostrato nella figura 11, il trattamento preventivo con DUTA ha ridotto notevolmente lo sviluppo delle discinesie prodotte dal trattamento con L-DOPA in ratti maschi emiparkinsoniani, in modo equiparabile alla FIN. Per entrambi i trattamenti, la dose più bassa (DUTA 15 e FIN 30) è risultata già efficace in modo massimale.

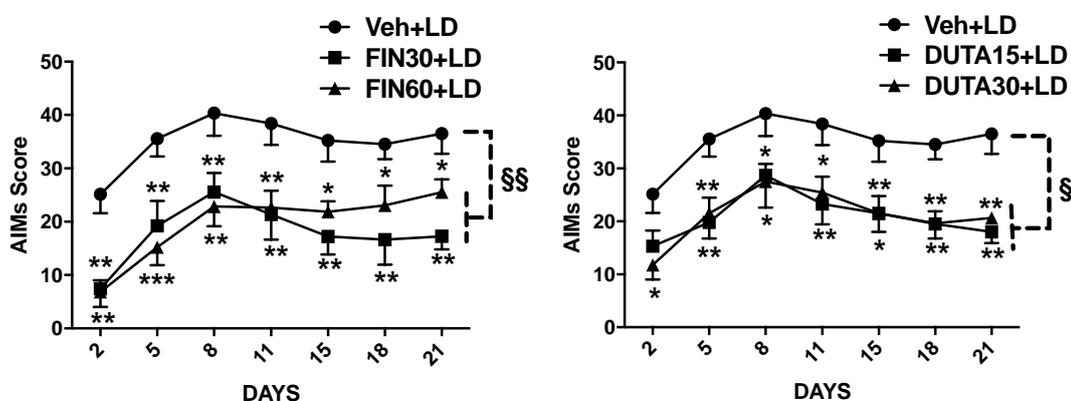


Fig. 11 Andamento temporale degli AIMs durante il trattamento cronico preventivo con FIN (30 e 60 mg/kg) o DUTA (15 e 30 mg/kg) in ratti maschi emiparkinsoniani. I dati sono la media \pm SEM degli AIMs rilevati. Tukey's test *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$ vs il gruppo Veh+LD

Il test ANOVA a due vie per misure ripetute ha indicato per la FIN un significativo effetto del tempo ($F_{(6, 144)} = 17.9$, $p < 0.0001$) e del trattamento ($F_{(2,24)} = 9.31$, $p < 0.001$), ed entrambe le dosi sono risultate significativamente diverse dal veicolo (Tukey's test = $p < 0.01$); anche per la DUTA sia il tempo ($F_{(6, 156)} = 17$, $p < 0.0001$) che il trattamento ($F_{(2, 26)} = 7.2$, $p < 0.01$) hanno dato una differenza significativa, come pure è stata significativa quella fra entrambe le dosi di DUTA e il Veh (Tukey's test = $p < 0.05$).

Come atteso, lo stepping test ha confermato la capacità della L-DOPA di migliorare la performance della zampa anteriore controlaterale alla lesione.

Inoltre, entrambe le dosi di DUTA non hanno interferito con l'effetto terapeutico della L-DOPA. Questo andamento, notato al primo giorno di trattamento, si è mantenuto anche al 24° giorno (Fig. 9).

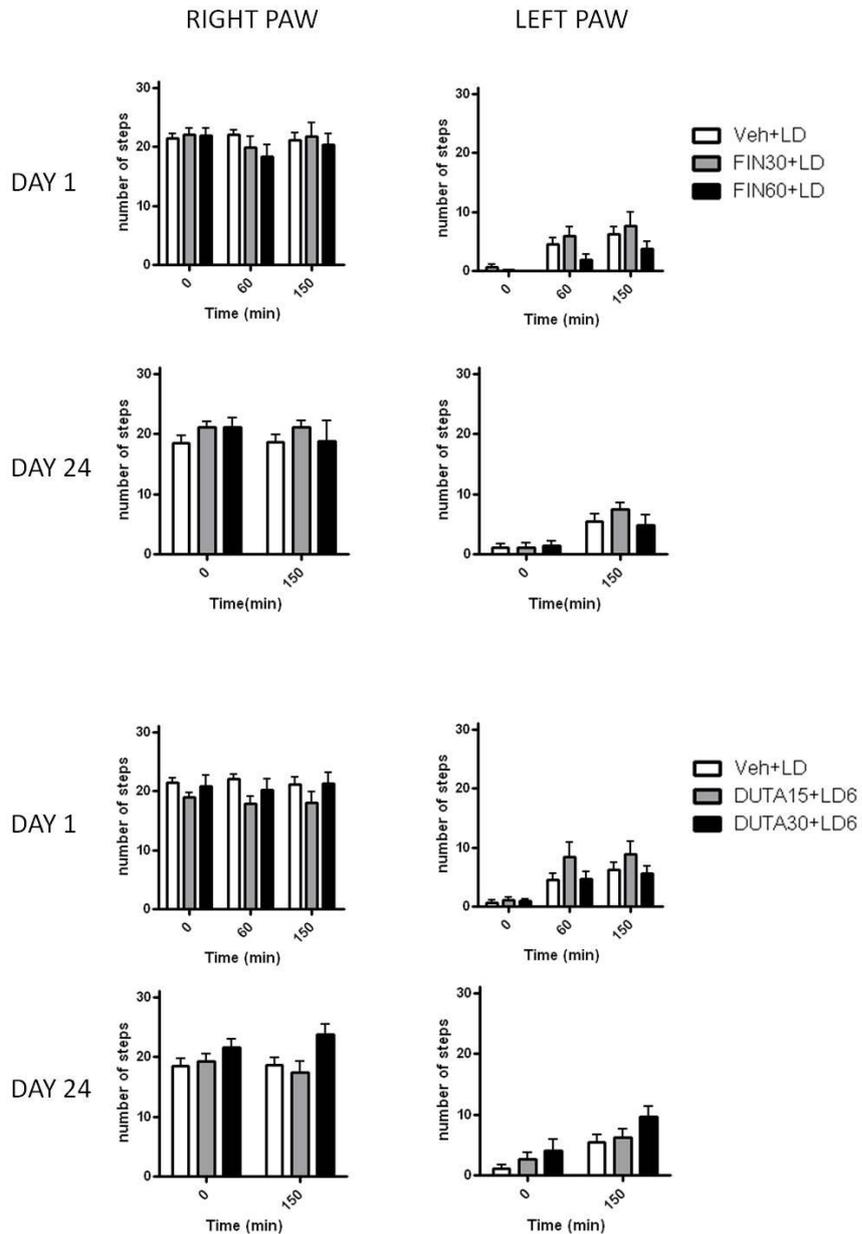


Fig. 12 Effetto del trattamento cronico preventivo con FIN (30 e 60 mg/kg i.p.) e DUTA (15 e 30 mg/kg i.p.) sull'utilizzo della zampa anteriore controlaterale alla lesione.

DISCUSSIONE

I risultati del presente studio mostrano, sebbene in maniera indiretta, una significativa influenza dei neurosteroidi sulle discinesie indotte da L-DOPA. Infatti, per la prima volta abbiamo dimostrato che l'inibizione della 5AR, enzima chiave implicato nel metabolismo degli androgeni e nella sintesi dei neurosteroidi, riduce in modo significativo lo sviluppo e l'espressione delle discinesie indotte sia dalla L-DOPA che da diversi agonisti dopaminergici in ratti lesionati con 6-OHDA.

In questo lavoro abbiamo testato due inibitori, la finasteride e la dutasteride, caratterizzati da una struttura molecolare molto simile e lo stesso target farmacologico (la 5AR) ma con affinità significativamente differente. Infatti, sebbene entrambi i farmaci bloccino entrambe le isoforme (5AR1 e 5AR2), la dutasteride inibisce più efficacemente la isoforma 1 rispetto alla 2.

Inoltre, è importante evidenziare come la dose più bassa di finasteride (30 mg/kg) somministrata cronicamente prima della introduzione della L-DOPA (trattamento preventivo), ha significativamente ridotto l'insorgenza delle discinesie, in maniera quasi equiparabile alla dose più alta. Questo risultato è reso ancor più interessante dal fatto che questa dose non ha interferito sull'efficacia terapeutica della L-DOPA, misurata attraverso lo *stepping test*. La capacità della finasteride di preservare gli effetti terapeutici del farmaco maggiormente utilizzato per il trattamento delle problematiche motorie nella MP, rappresenta un presupposto fondamentale e indispensabile per traslare nuove potenziali terapie dalla preclinica al paziente.

In accordo con precedenti studi (Frau et al., 2013), i test eseguiti in acuto con i diversi agonisti dopaminergici, hanno indicato che l'effetto antidiscinetico della finasteride potrebbe essere esercitato attraverso la modulazione dei principali *pathways* recettoriali implicati nell'espressione delle discinesie, D1 e D2/D3 (Bastide et al., 2015; Cenci & Konradi, 2010; Solís et al., 2015;). In aggiunta, l'efficacia mostrata dalla finasteride nel contrastare le discinesie indotte da apomorfina, non sembrano indicare un'azione a livello del terminale presinaptico, quindi escludendo la possibilità che la finasteride possa modulare il rilascio di dopamina da parte dei neuroni serotoninergici (Carta & Bezard, 2011).

La finasteride ha mostrato attività antidiscinetica anche in ratti femmine dello stesso ceppo di appartenenza e tipo di lesione. Tuttavia, mettendo a confronto i due generi, si evince una maggiore efficacia del farmaco nel sesso maschile. Questo dato può essere dovuto al fatto che l'espressione e attività della 5AR sono finemente regolati dagli ormoni sessuali (Sanchez et al., 2006). Pertanto, la differente sensibilità agli effetti della finasteride osservata nei due generi, può essere imputabile a un diverso coinvolgimento delle due isoforme nei maschi e nelle femmine. Per esempio, è stato ripetutamente dimostrato che l'isoforma 2 della 5AR risulta essere più sensibile agli effetti del testosterone nei ratti maschi rispetto alle femmine, mentre l'isoforma di tipo 1 è regolata negativamente dagli androgeni (Torres & Ortega, 2003). L'elevata sensibilità alla finasteride riscontrata nei maschi potrebbe quindi rispecchiare una diversa espressione e/o attività delle due isoforme della 5AR, come risultato dei diversi livelli fisiologici di testosterone presenti nei due generi.

Date queste evidenze e considerando che questo farmaco è utilizzato solo negli uomini per il trattamento della iperplasia prostatica benigna e per l'alopecia androgenetica, è pensabile che anche un eventuale studio clinico degli effetti della finasteride sulle discinesie possa essere, almeno inizialmente, condotto su soggetti di sesso maschile.

Precedenti studi in differenti modelli animali, hanno ripetutamente dimostrato che gli effetti terapeutici della finasteride siano dovuti alla capacità di modulare negativamente la trasmissione dopaminergica. Per esempio, nei ratti e nei topi, iniezioni sistemiche di finasteride hanno normalizzato i deficit della PPI e i comportamenti stereotipati evocati dagli agonisti dopaminergici selettivi e non selettivi, ma non dall'antagonista del recettore N-metil-d-aspartato (Bortolato et al., 2008). Successivi studi ci hanno permesso di dimostrare che questi effetti comportamentali erano dovuti a una modulazione negativa dei recettori dopaminergici dello striato e in parte della corteccia prefrontale (Devoto et al., 2012). Inoltre, è importante evidenziare che studi più recenti atti a definire il meccanismo d'azione di questi inibitori, hanno chiaramente indicato come gli effetti antidopaminergici della finasteride siano basati su una modulazione negativa dei recettori D1 e D3 (Frau et al., 2016, 2013; Mosher et al., 2016). Studi di *binding* hanno dimostrato che la finasteride non blocca i recettori dopaminergici con un classico meccanismo di antagonismo recettoriale; infatti, gli effetti della finasteride non sembrano essere accompagnati da disturbi extrapiramidali, come invece osservato con i farmaci antidopaminergici maggiormente utilizzati in terapia.

In maniera simile alla finasteride, la dutasteride, ha ridotto notevolmente l'insorgenza e sviluppo delle discinesie indotte da L-DOPA, senza interferire con il suo effetto terapeutico. Questo dato assume particolare importanza, in quanto conferma che il target farmacologico della finasteride risiede nella 5AR, e propone una valida alternativa terapeutica nei pazienti che mostrano differente sensibilità agli effetti dei due inibitori, sia in termini di efficacia che di effetti indesiderati, così come riportato per questi farmaci nei trial clinici e negli studi retrospettivi per il trattamento delle disfunzioni prostatiche e calvizie.

Inoltre, in accordo con la maggiore affinità per le 2 isoforme (100 volte per la 1 e 3 volte per la 2), nei nostri studi la dutasteride risulta essere più efficace a dosaggi inferiori rispetto alla finasteride. Questo dato è in linea con quanto osservato nei pazienti, nei quali la dutasteride è prescritta a dosaggi inferiori per il trattamento dell'iperplasia prostatica benigna.

Recentemente il nostro gruppo ha riportato come il blocco della 5AR alteri in modo significativo i livelli di diversi neurosteroidi (Frau et al., 2015). Infatti, la somministrazione acuta di finasteride induce una significativa riduzione del suo metabolita principale allopregnanolone, e in un accumulo dei suoi substrati pregnenolone e deidroepiandrosterone nello striato (Frau et al., 2015). Questo dato è di rilevante importanza, dato che una vasta letteratura suggerisce che questi neurosteroidi possiedono un'azione modulatoria sul sistema dopaminergico (Di Paolo, 1994; Sanchez et al., 2010). Per esempio, il pregnenolone sembrerebbe agire come un potente agonista dei recettori $\sigma 1$ (Maurice et al., 2006), strettamente implicati nella regolazione del segnale del recettore D1 (Navarro et al., 2010); l'allopregnanolone e il

deidroepiandrosterone solfato modulano gli effetti comportamentali dell'attivazione dei recettori D1 (Frye et al., 2006; Dong et al., 2007), inoltre l'allopregnanolone è in grado di influenzare la fosforilazione di DARPP-32 (Mani et al., 2000; Frye & Walf, 2010), proteina chiave nella cascata molecolare del recettore D1 e nelle discinesie (Svenningsson et al., 2004; Picconi et al., 2003; Santini et al., 2007).

Quindi, differentemente dal classico utilizzo di questi inibitori in clinica per le loro proprietà antiandrogene, l'effetto antidiscinetico osservato nei nostri studi potrebbe essere dovuto al contributo di altri neurosteroidi, con particolare riguardo ai substrati della 5AR. Tuttavia è bene sottolineare che, negli studi neurochimici, non è stato possibile misurare i livelli del principale prodotto della 5AR nello striato, diidrotosterone, perché sotto i limiti di sensibilità degli strumenti utilizzati. Pertanto un coinvolgimento negli androgeni negli effetti antidiscinetici degli inibitori della 5AR non può essere escluso.

Alla luce di tutte queste evidenze, la 5AR sembra avere tutte le proprietà per essere un possibile target terapeutico in pazienti parkinsoniani. Certamente, sono necessari ulteriori studi e investigazioni mirate soprattutto ai suoi effetti sulle discinesie nei pazienti. Al momento, è comunque importante evidenziare che la finasteride ha prodotto incoraggianti effetti terapeutici in diverse patologie caratterizzate da alterazioni del sistema dopaminergico. Infatti, questo inibitore ha significativamente ridotto i tic motori e fonici in pazienti affetti da Sindrome di Tourette (Bortolato et al., 2007) e ha attenuato le distonie che accompagnano il blefarospasmo essenziale benigno (Bortolato et al., 2010). Inoltre, è importante notare che recentemente la finasteride ha mostrato una marcata efficacia

terapeutica nella sindrome da disregolazione dopaminergica in pazienti parkinsoniani (Bortolato et al., 2010; 2012).

Pertanto, i risultati preclinici di questo studio, il profilo farmacologico e le potenzialità terapeutiche osservate nei pazienti, supportano l'utilizzo di questi inibitori per il trattamento delle discinesie in pazienti parkinsoniani sotto trattamento con dopaminomimetici.

BIBLIOGRAFIA

Albarran Bravo S, Rangel-Barajas C, Florán Garduño B (2014). Pathophysiology of L-Dopa Induced Dyskinesia — Changes in D1/D3 Receptors and Their Signaling Pathway. *Qayyum Rana, ISBN 978-953-51-1229-7*.

Aubert I, Guigoni C, Håkansson K, Li Q, Dovero S, Barthe N, Bioulac BH, Gross CE, Fisone G, Bloch B, Bezard E (2005). Increased D1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann Neurol. 57(1):17-26*.

Baldereschi M, Di Carlo A, Rocca WA, Vanni P, Maggi S, Perissinotto E, Grigoletto F, Amaducci L, Inzitari D (2000). Parkinson's disease and parkinsonism in a longitudinal study: two-fold higher incidence in men. ILSA Working Group. Italian Longitudinal Study on Aging. *Neurology. 14;55(9):1358-63*.

Baron JA (1986). Cigarette smoking and Parkinson's disease. *Neurology. 36(11):1490-6*.

Barone P, Morelli M, Popoli M, Ciccarelli G, Campanella G, Di Chiara G. (1994). Behavioural sensitization in 6-hydroxydopamine lesioned rats involves the dopamine signal transduction: changes in DARPP-32 phosphorylation. *Neuroscience. 61(4):867-73*.

Bastide MF, Bézard E (2015). L-dopa induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Bull Acad Natl Med. 199(2-3):201-12*.

Bastide MF, Meissner WG, Picconi B, Fasano S, Fernagut PO, Feyder M, Francardo V, Alcacer C, Ding Y, Brambilla R, Fisone G, Jon Stoessl A, Bourdenx M, Engeln M, Navailles S, De Deurwaerdère P, Ko WK, Simola N, Morelli M, Groc L, Rodriguez MC, Gurevich EV, Quik M, Morari M, Mellone M, Gardoni F, Tronci E, Guehl D, Tison F, Crossman AR, Kang UJ, Steece-Collier K, Fox S, Carta M, Angela Cenci M, Bézard E (2015). Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 132:96-168.

Baulieu E E (1981). Steroid Hormone Regulation of the Brain. *Fuxe K, Gustafsson J A, editors. Oxford: Pergamon. pp. 3–14.*

Berthet A, Bezard E (2009). Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia. *Parkinsonism Relat Disord.* 15 Suppl 4:S8-12.

Bezard E, Tronci E, Pioli EY, Li Q, Porras G, Björklund A, Carta M (2013). Study of the antidyskinetic effect of eltopazine in animal models of levodopa-induced dyskinesia. *Mov Disord.* 28:1088-96.

Björklund A, Dunnett SB (2007). Dopamine neuron systems in the brain: an update. *Trends Neurosci.* 30(5):194-202.

Blanchet PJ, Konitsiotis S, Chase TN (1998). Amantadine reduces levodopa-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Mov Disord.* 13(5):798-802.

Bortolato M, Cannas A, Solla P, Bini V, Puligheddu M, Marrosu F (2012). Finasteride attenuates pathological gambling in patients with Parkinson disease. *J. Clin. Psychopharmacol.* 32, 424-425.

Bortolato M, Cannas A, Solla P, Puligheddu M, Muroi A, Marrosu F (2010). Treatment of benign essential blepharospasm with finasteride: a case report. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 207-208.

Bortolato M, Frau R, Orrù M, Bourov Y, Marrosu F, Mereu G, Devoto P, Gessa GL (2008). Antipsychotic-like properties of 5-alpha-reductase inhibitors. *Neuropsychopharmacology.* 33(13):3146-56.

Bortolato M, Frau R, Godar SC, Mosher LJ, Paba S, Marrosu F, Devoto P (2013). The implication of neuroactive steroids in Tourette's syndrome pathogenesis: A role for 5 α -reductase? *J Neuroendocrinol.* 2013 Nov;25(11):1196-208.

Bortolato M, Muroi A, Marrosu F (2007). Treatment of Tourette's syndrome with finasteride. *Am J Psychiatry.* 164(12):1914-5.

Breedlove SM (1992). Sexual dimorphism in the vertebrate nervous system. *J Neurosci.* 12(11):4133-42.

Calne DB, Snow BJ, Lee C (1992). Criteria for diagnosing Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 32 Suppl:S125-7.

Carta AR, Fenu S, Pala P, Tronci E, Morelli M, (2003). Selective modifications in GAD67 mRNA levels in striatonigral and striatopallidal pathways correlate to dopamine agonist priming in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Eur. J. Neurosci.* 18, 10.

Carta M, Carlsson T, Kirik D, Björklund A (2007). Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain*. 130(Pt 7):1819-33.

Carta M, Carlsson T, Muñoz A, Kirik D, Björklund A (2010). Role of serotonin neurons in the induction of levodopa- and graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Mov Disord*. 25 Suppl 1:S174-9.

Carta M, Bezard E (2011). Contribution of pre-synaptic mechanisms to L-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience*. 15;198:245-51.

Cenci MA, Lee CS, Björklund A (1998). L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *Eur J Neurosci*. 10(8):2694-706.

Cenci MA, Lundblad M (2006). Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem*. 99(2):381-92.

Cenci MA, Konradi C (2010). Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Prog Brain Res*. 183:209-33.

Clarke CE, Cooper JA, Holdich TA; TREMOR Study Group (2001). A randomized, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose tolerability and safety study of remacemide as adjuvant therapy in Parkinson's disease with response fluctuations. *Clin Neuropharmacol*. 24(3):133-8.

Compagnone NA, Mellon SH (2000). Neurosteroids: biosynthesis and function of these novel neuromodulators. *Front Neuroendocrinol*. 21(1):1-56.

Coppedè F (2012). Genetics and epigenetics of Parkinson's disease. *ScientificWorldJournal*. 2012:489830.

Cotzias GC, van Woert MH, Schiffer LM (1967). Aromatic amino acids and modification of parkinsonism. *N Engl J Med* 276:374–379.

Dahlström A, Fuxe K. Localization of monoamines in the lower brain stem (1964). *Experientia*. 15;20(7):398-9.

Del Sorbo & Albanese (2008). L-DOPA induced dyskinesia and their management. *J Neurol* 255 [Suppl 4]:32–41.

Devoto P, Frau R, Bini V, Pillolla G, Saba P, Flore G, Corona M, Marrosu F, Bortolato M (2012). Inhibition of 5 α -reductase in the nucleus accumbens counters sensorimotor gating deficits induced by dopaminergic activation. *Psychoneuroendocrinology*. 37(10):1630-45.

Di Monte DA, McCormack A, Petzinger G, Janson AM, Quik M, Langston WJ (2000). Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. *Mov Disord*. 15(3):459-66.

Di Paolo T (1994). Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids. *Rev Neurosci*. 5(1):27-41.

Disshon KA, Dluzen DE (2000). Estrogen reduces acute striatal dopamine responses in vivo to the neurotoxin MPP+ in female, but not male rats. *Brain Res*. 868(1):95-104.

Durif F, Deffond D, Dordain G, Tournilhac M (1994). Apomorphine and diphasic dyskinesia. *Clin Neuropharmacol* 17:99–102.

Dong LY, Cheng ZX, Fu YM, Wang ZM, Zhu YH, Sun JL, Dong Y, Zheng P (2007). Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate enhances spontaneous glutamate release in rat prelimbic cortex through activation of dopamine D1 and sigma-1 receptor. *Neuropharmacology*. 52, 966-974.

Emborg ME (2007). Nonhuman primate models of Parkinson's disease. *ILAR J*. 48(4):339-55.

Feyder M, Bonito-Oliva A, Fisone G (2011). L-DOPA-Induced Dyskinesia and Abnormal Signaling in Striatal Medium Spiny Neurons: Focus on Dopamine D1 Receptor-Mediated Transmission. *Front Behav Neurosci*. 5:71.

Fiorentini C, Savoia P, Savoldi D, Bono F, Busi C, Barbon A, Missale C (2016). Shp-2 knockdown prevents l-dopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Mov Disord*. 31(4):512-20.

Frank C, Pari G, Rossiter JP (2006). Approach to diagnosis of Parkinson disease. *Can Fam Physician*. 52:862-8.

Frau R, Abbiati F, Bini V, Casti A, Caruso D, Devoto P, Bortolato M (2015). Targeting neurosteroid synthesis as a therapy for schizophrenia-related alterations induced by early psychosocial stress. *Schizophr Res*. 168(3):640-8.

Frau R, Mosher LJ, Bini V, Pillolla G, Pes R, Saba P, Fanni S, Devoto P, Bortolato M (2016). The neurosteroidogenic enzyme 5 α -reductase modulates

the role of D1 dopamine receptors in rat sensorimotor gating. *Psychoneuroendocrinology*. 63:59-67.

Frau R, Pillolla G, Bini V, Tambaro S, Devoto P, Bortolato M (2013). Inhibition of 5 α -reductase attenuates behavioral effects of D1-, but not D2-like receptor agonists in C57BL/6 mice. *Psychoneuroendocrinology*.38(4):542-51.

Frye CA, Walf AA (2010). Infusions of anti-sense oligonucleotides for DARPP-32 to the ventral tegmental area reduce effects of progesterone- and a dopamine type 1-like receptor agonist to facilitate lordosis. *Behav. Brain Res*. 206, 286-292.

Frye CA, Walf AA, Petralia SM (2006). Progestins' effects on sexual behaviour of female rats and hamsters involving D1 and GABA(A) receptors in the ventral tegmental area may be G-protein-dependent. *Behav. Brain Res*. 172, 286-293.

Fuxe K, Agnati LF (1985). Receptor-receptor interactions in the central nervous system. A new integrative mechanism in synapses. *Med Res Rev*. 5(4):441-82.

Gelb DJ, Oliver E, Gilman S (1999). Diagnostic criteria for Parkinson disease. *Arch Neurol*.56(1):33-9.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR (1990). D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*. 250(4986):1429-32.

Giuffra ME, Sethy VH, Davis TL, Mouradian MM, Chase TN (1993). Milacemide therapy for Parkinson's disease. *Mov Disord*. 8(1):47-50.

Glinka Y, Gassen M, Youdim MB (1997). Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity. *J Neural Transm Suppl.* 1997;50:55-66.

Gorell JM, Johnson CC, Rybicki BA, Peterson EL, Richardson RJ (1998). The risk of Parkinson's disease with exposure to pesticides, farming, well water, and rural living. *Neurology.*50(5):1346-50.

Guigoni C, Doudnikoff E, Li Q, Bloch B, Bezard E (2007). Altered D(1) dopamine receptor trafficking in parkinsonian and dyskinetic non-human primates. *Neurobiol Dis.* 26(2):452-63.

Hatano T, Kubo S, Sato S, Hattori N (2009). Pathogenesis of familial Parkinson's disease: new insights based on monogenic forms of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 111(5):1075-93.

Hertzman C, Wiens M, Bowering D, Snow B, Calne D (1990). Parkinson's disease: a case-control study of occupational and environmental risk factors. *Am J Ind Med.* 17(3):349-55.

Hoehn MM, Yahr MD (1967). Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology.* 17(5):427-42.

Isacson O, Hantraye P, Maziere M, Sofroniew MV, Riche D (1990). Apomorphine-induced dyskinesias after excitotoxic caudate-putamen lesions and the effects of neural transplantation in non-human primates. *Prog Brain Res* 82:523–533.

Jenner P (2008) Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat Rev Neurosci.* 9(9):665-77.

Kenchappa RS, Diwakar L, Annepu J, Ravindranath V (2004). Estrogen and neuroprotection: higher constitutive expression of glutaredoxin in female mice offers protection against MPTP-mediated neurodegeneration. *FASEB J.* 18(10):1102-4.

Khisti RT, Deshpande LS, Chopde CT (2002). The neurosteroid 3 alpha-hydroxy-5 alpha-pregnan-20-one affects dopamine-mediated behavior in rodents. *Psychopharmacology (Berl).* 161(2):120-8.

Kirik D, Winkler C, Björklund A (2001). Growth and functional efficacy of intrastriatal nigral transplants depend on the extent of nigrostriatal degeneration. *J Neurosci.* 21:2889-96.

Kleedorfer B, Lees AJ, Stern GM (1991). Buspirone in the treatment of levodopa induced dyskinesias. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 54(4):376-7.

Labandeira-Garcia JL, Rodriguez-Perez AI, Valenzuela R, Costa-Besada MA, Guerra MJ (2016). Menopause and Parkinson's disease. Interaction between estrogens and brain renin-angiotensin system in dopaminergic degeneration. *Front Neuroendocrinol.*43:44-59.

Lebel M, Chagniel L, Bureau G, Cyr M (2010). Striatal inhibition of PKA prevents levodopa-induced behavioural and molecular changes in the hemiparkinsonian rat. *Neurobiol Dis.* 38(1):59-67.

Litim N, Bourque M, Al Sweidi S, Morissette M, Di Paolo T (2015). The 5 α -reductase inhibitor Dutasteride but not Finasteride protects dopamine neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*. 97:86-94.

Litim N, Morissette M, Di Paolo T (2016). Neuroactive gonadal drugs for neuroprotection in male and female models of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev*. 67:79-88.

Liu R, Baird D, Park Y, Freedman ND, Huang X, Hollenbeck A, Blair A, Chen H (2014). Female reproductive factors, menopausal hormone use, and Parkinson's disease. *Mov Disord*.29(7):889-96.

Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci*. 15:120-32.

Lundblad M, Vaudano E, Cenci MA (2003). Cellular and behavioural effects of the adenosine A2a receptor antagonist KW-6002 in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurochem*. 84:1398-410.

Luquin MR, Scipioni O, Vaamonde J, Gershanik O, Obeso JA (1992). Levodopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease: clinical and pharmacological classification. *Mov Disord*. 7:117-24.

Majewska MD, Harrison NL, Schwartz RD, Barker JL, Paul SM (1986). Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor. *Science*. 23;232(4753):1004-7.

Mani SK, Fienberg AA, O'Callaghan JP, Snyder GL, Allen PB, Dash PK, Moore AN, Mitchell AJ, Bibb J, Greengard P, O'Malley BW (2000). Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science*. 287, 1053-1056.

Martini L, Celotti F, Melcangi RC (1996). Testosterone and progesterone metabolism in the central nervous system: cellular localization and mechanism of control of the enzymes involved. *Cell Mol Neurobiol*. 16(3):271-82.

Martini L, Melcangi RC, Maggi R (1993). Androgen and progesterone metabolism in the central and peripheral nervous system. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 47(1-6):195-205.

Maurice T, Grégoire C, Espallergues J (2006). Neuro(active)steroids actions at the neuromodulatory sigma1 (sigma1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol Biochem Behav*. 84(4):581-97.

Mazzio EA, Reams RR, Soliman KF (2004). The role of oxidative stress, impaired glycolysis and mitochondrial respiratory redox failure in the cytotoxic effects of 6-hydroxydopamine in vitro. *Brain Res*. 1004:29-44.

Melamed E (1979). Early-morning dystonia. A late side effect of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. *Arch Neurol*. 36(5):308-10.

Merello M, Nouzeilles MI, Cammarota A, Leiguarda R (1999). Effect of memantine (NMDA antagonist) on Parkinson's disease: a double-blind crossover randomized study. *Clin Neuropharmacol*. 22(5):273-6.

Mosher LJ, Frau R, Pardu A, Pes R, Devoto P, Bortolato M (2016). Selective activation of D1 dopamine receptors impairs sensorimotor gating in Long-Evans rats. *Br J Pharmacol.* 173(13):2122-34.

Nyholm D, Jansson R, Willows T, Remahl IN (2005). Long-term 24-hour duodenal infusion of levodopa: outcome and dose requirements. *Neurology.* 65(9):1506-7.

Navarro G, Moreno E, Aymerich M, Marcellino D, McCormick PJ, Mallol J, Cortés A, Casadó V, Canela EI, Ortiz J, Fuxe K, Lluís C, Ferré S, Franco R (2010). Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(43):18676-81.

Parkinson J.(1917) An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 2002 Spring;14(2):223-36; discussion 222.

Paul SM, Purdy RH (1992). Neuroactive steroids. *FASEB J.* 6(6):2311-22.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. *San Diego: Academic Press; 1998.*

Picconi B, Centonze D, Håkansson K, Bernardi G, Greengard P, Fisone G, Cenci MA, Calabresi P (2003). Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Neurosci.* 6 (5) : 501-506.

Plassart-Schiess E, Baulieu EE (2001). Neurosteroids: recent findings. *Brain Res* 37(1-3):133-40.

Poletti A, Coscarella A, Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Martini L (1998). 5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids*. 63(5-6):246-51.

Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*. 27;276(5321):2045-7.

Rajput AH, Uitti RJ, Stern W, Laverty W (1986). Early onset Parkinson's disease in Saskatchewan--environmental considerations for etiology. *Can J Neurol Sci*. 13(4):312-6.

Rajput AH, Rozdilsky B, Ang L (1991). Occurrence of resting tremor in Parkinson's disease. *Neurology*. 41(8):1298-9.

Reddy DS (2010). Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res*. 2010;186:113-37.

Riess O, Jakes R, Krüger R (1998). Genetic dissection of familial Parkinson's disease. *Mol Med Today*. 4(10):438-44.

Ross GW, Abbott RD, Petrovitch H, Morens DM, Grandinetti A, Tung KH, Tanner CM, Masaki KH, Blanchette PL, Curb JD, Popper JS, White LR (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*. 24-31;283(20):2674-9.

Rupprecht R, Holsboer F (2001). Neuroactive steroids in neuropsychopharmacology. *International review of neurobiology* 46:461-477.

Sánchez MG, Bourque M, Morissette M, Di Paolo T (2010). Steroids-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci Ther.* 16(3):e43-71.

Sánchez P, Torres JM, Del Moral RG, Ortega E (2006). Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5 α -reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem Int* 49(6):626-30.

Santini E, Valjent E, Usiello A., Carta M, Borgkvist A, Girault JA, Hervé D, Greengard P, Fisone G (2007). Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 27, 6995-7005.

Santini E, Feyder M, Gangarossa G, Bateup HS, Greengard P, Fisone G (2012). Dopamine-and cAMP-regulated phosphoprotein of 32-kDa (DARPP-32)-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in experimental parkinsonism. *J Biol Chem.* 287(33):27806-12.

Schapira AH, Jenner P (2011). Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 26(6):1049-55.

Semchuk KM, Love EJ, Lee RG (1993). Parkinson's disease: a test of the multifactorial etiologic hypothesis. *Neurology.* 43(6):1173-80.

Solís O, Garcia-Montes JR, González-Granillo A, Xu M, Moratalla R (2015). Dopamine D3 Receptor Modulates L-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling. *Cereb Cortex. pii: bhv231*.

Svenningsson P, Nishi A, Fisone G, Girault JA, Nairn AC, Greengard P (2004). DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 44, 269-296*

Torres JM, Ortega E (2003). Differential regulation of steroid 5alpha-reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J. 17(11):1428-33*.

Tronci E, Fidalgo C, Zianni E, Collu M, Stancampiano R, Morelli M, Gardoni F, Carta M (2014). Effect of memantine on L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience. 265:245-52*.

Tronci E, Lisci C, Stancampiano R, Fidalgo C, Collu M, Devoto P, Carta M (2013). 5-Hydroxy-tryptophan for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia in the rat Parkinson's disease model. *Neurobiol Dis. 60:108-14*.

Westin JE, Vercaemmen L, Strome EM, Konradi C, Cenci MA (2007). Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol Psychiatry. 62(7):800-10*.

Winkler C, Kirik D, Björklund A, Cenci MA (2002). L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease: relation to

motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis.* 2002; 10:165-86.

Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J (2004). Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 75(4):637-9.

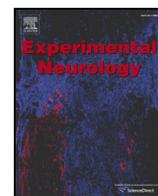
Yamamoto KR (1985). Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet.* 19:209-52.

Yi H, Bao X, Tang X, Fan X, Xu H (2016). Estrogen modulation of calretinin and BDNF expression in midbrain dopaminergic neurons of ovariectomised mice. *J Chem Neuroanat.* 77:60-67.

RINGRAZIAMENTI

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Neuroscienze dell'Università degli Studi di Cagliari, XXIX ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività I.3.1 "Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell'ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell'energia e dello sviluppo sostenibile, dell'agroalimentare e dei materiali tradizionali".

APPENDICE



Research Paper

The 5- α reductase inhibitor finasteride reduces dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease



Roberto Frau^{a,1}, Paola Savoia^{b,1}, Silvia Fanni^a, Chiara Fiorentini^b, Camino Fidalgo^a, Elisabetta Tronci^a, Roberto Stancampiano^a, Mario Meloni^c, Antonino Cannas^c, Francesco Marrosu^c, Marco Bortolato^d, Paola Devoto^a, Cristina Missale^{b,1}, Manolo Carta^{a,*}

^a Dept. of Biomedical Sciences, University of Cagliari, Cittadella Universitaria SP 8, Monserrato 09042, Italy

^b Section of Pharmacology, Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Piazza del Mercato, 15, 25121 Brescia, Italy

^c Movement Disorders Center, Department of Public Health, Clinical and Molecular Medicine, University of Cagliari, Cittadella Universitaria SP 8, Monserrato 09042, Italy

^d Dept. of Pharmacology and Toxicology, College of Pharmacy, University of Utah, 30 S 2000 E, Salt Lake City, UT 84112, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 December 2016

Received in revised form 13 January 2017

Accepted 24 January 2017

Available online 26 January 2017

Keywords:

5-Alpha-Reductase
finasteride
L-DOPA
dyskinesia
Parkinson's disease

ABSTRACT

Levodopa-induced dyskinesia (LID) is a disabling motor complication occurring in Parkinson's disease patients (PD) after long-term L-DOPA treatment. Although its etiology remains unclear, there is accumulating evidence that LID relies on an excessive dopamine receptor transmission, particularly at the downstream signaling of D₁ receptors. We previously reported that the pharmacological blockade of 5- α reductase (5AR), the rate limiting enzyme in neurosteroids synthesis, rescued a number of behavioral aberrations induced by D₁ receptor-selective and non-selective agonists, without inducing extrapyramidal symptoms. Thus, the present study was designed to verify whether the 5AR inhibitor finasteride (FIN) may counteract the dyskinesias induced by dopaminergic agonists in 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats. First, we assessed the acute and chronic effect of different doses of FIN (30–60 mg/kg) on LID, in male 6-OHDA-lesioned dyskinetic rats. Thereafter, to fully characterize the therapeutic potential of FIN on LID and its impact on L-DOPA efficacy, we assessed abnormal involuntary movements and forelimb use in hemiparkinsonian male rats chronically injected with FIN (30–60 mg/kg/24 days) either prior to- or concomitant with L-DOPA administration. In addition, to investigate whether the impact of FIN on LID may be ascribed to a modulation of the D₁- or D₂/D₃-receptor function, dyskinesias were assessed in L-DOPA-primed 6-OHDA-lesioned rats that received FIN in combination with selective direct dopaminergic agonists. Finally, we set to investigate whether FIN may produce similar effect in female hemiparkinsonian rats, as seen in males.

The results indicated that FIN administrations significantly dampened LID in all tested treatment regimens, without interfering with the ability of L-DOPA to ameliorate forelimb use in the stepping test. The antidyskinetic effect appears to be due to modulation of both D₁- and D₂/D₃-receptor function, as FIN also reduced abnormal involuntary movements induced by the selective D₁ receptor agonist SKF-82958 and the D₂/D₃ receptor agonist ropinirole. Significant dampening of LID was also observed in female rats, although only at the higher tested dose. Clinical investigations are warranted to assess whether similar protection from dyskinesia is seen in PD patients.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) is the gold-standard treatment for the motor symptoms of Parkinson's disease (PD); however, its chronic use induces severe motor complications that eventually limit its long-term efficacy (Bastide et al., 2015). The most disabling side effect is represented by the onset of dyskinesias, involuntary choreo-dystonic movements that dramatically affect patients' quality

of life. L-DOPA-induced dyskinesias (LIDs) have been shown to reflect abnormal dopaminergic transmission (Berthet and Bezard, 2009; Bastide et al., 2015), and, in particular, dysfunctions in downstream signaling of D₁ receptors (Fiorentini et al., 2016; Aubert et al., 2005; Feyder et al., 2011; Westin et al., 2007).

Converging evidence shows that dopamine signaling is modulated by neuroactive steroids (NASs) (Di Paolo, 1994; Sánchez et al., 2010); in particular, we previously reported that the behavioral effects of dopaminergic agonists are influenced by inhibition of 5- α reductase (5AR), a key rate-limiting enzyme in NASs synthesis/metabolism (Paba et al., 2011). Specifically, we showed that, in rodent models, the 5AR inhibitors finasteride (FIN) and dutasteride attenuated the severity

* Corresponding author.

E-mail address: manolocarta@unica.it (M. Carta).

¹ These authors contributed equally to this work.

of a broad set of behavioral alterations induced by D₁ receptor-selective and non-selective agonists, such as hyperactivity, stereotyped behaviors and prepulse inhibition deficits (Frau et al., 2016; Frau et al., 2013). Of note, these antidopaminergic effects were not accompanied by extrapyramidal symptoms, even at the higher tested doses (Bortolato et al., 2008). Furthermore, recent evidence has shown that 5AR inhibition may elicit neuroprotective effects in animal models of PD (Litim et al., 2015, 2016).

Based on this evidence, we postulated that 5AR inhibition may exert therapeutic properties on LID, and tested this hypothesis investigating whether FIN may impact on the development and expression of dyskinesia induced by L-DOPA in male and female 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-lesioned rats. In addition, we investigated whether FIN may interfere with the ability of L-DOPA to ameliorate rat forelimb use in the stepping test, and whether reduction of LID takes place via modulation of D₁- or D₂/D₃-receptor function.

2. Material and methods

2.1. Animals

This study was conducted on male ($n = 180$, 275–300 g) and female ($n = 21$, 275–300 g) Sprague Dawley rats (Envigo, Italy). Animals were housed 3–4 per cage in standard conditions. All experiments were carried out in accordance with the European Union directive (EEC Council 86/609; D.P.R. 116/92).

2.2. Drugs

Finasteride was purchased from Carbosynth Limited (UK) and suspended in a vehicle (VEH) solution containing 5% Tween80 and 95% sterile saline (SAL; 0.9% NaCl). Apomorphine hydrochloride was purchased from Tocris Bioscience (UK), dissolved in SAL containing 0.1% (v/v) ascorbic acid to prevent oxidation. SKF-82958 hydrochloride was purchased from Carbosynth Limited (UK) and dissolved in distilled water. Ropinirole was purchased from Tocris Bioscience (UK) and diluted in SAL. 6-OHDA was purchased from Sigma-Aldrich (Italy), dissolved in SAL plus 0.02% ascorbic acid, and locally infused into the medial forebrain bundle (MFB). L-DOPA methyl-ester and benserazide were purchased from Research Organics (USA) and Sigma-Aldrich, respectively, and dissolved in SAL. A 20:1 mixture of Fentanest (Pfitzer, Italy) and Domitor® (Orion Pharma, Italy) in a volume range of 1.4–1.6 ml, IP, was used to induce general anaesthesia. Antisedan® (0.37 mg/kg, SC, Orion Pharma, Italy) was injected to reverse the sedative effect of the anesthetics.

2.3. 6-OHDA lesion

Male and female Sprague-Dawley rats were injected with 16 µg of 6-OHDA (4 µg/µl free base in SAL with 0.02% ascorbic acid) into the right MFB (AP: −4.4, ML: −1.2, DV: −7.8), according to Paxinos and Watson (2007), at the rate of 0.38–0.5 µl/min.

2.4. Stepping test

To investigate the severity of the dopaminergic lesion and the possible interference of FIN with the antiparkinsonian effect of L-DOPA, we evaluated the forelimb use in the stepping test. As previously described in Tronci et al. (2013), the rat was held by the experimenter fixing its hindlimbs with one hand and the forelimb not to be monitored with the other, while the unrestrained forepaw was touching the table. The number of adjusting steps was counted while the rat was moved sideways along a table surface (90 cm in 5 s), in the forehand and backhand direction for both forelimbs, and the average of the steps in the two directions was considered.

2.5. Assessment of abnormal involuntary movements (AIMs)

Abnormal involuntary movements (AIMs) were evaluated, as detailed previously (Lundblad et al., 2002; Cenci and Lundblad, 2007; Tronci et al., 2014). Rats were scored for 1 min every 20 min for 120 min after L-DOPA injection, by an experimenter blind to the treatment groups. AIMs were classified into three subtypes: forelimb, orolingual and axial, and the severity assessed using scores from 0 to 4.

2.6. Immunohistochemistry

The animals belonging to the chronic studies were sacrificed 24 h after the last drug injection and the brains were harvested for immunohistochemistry analyses. As described in Tronci et al. (2012), coronal sections from striatal and substantia nigra were processed for tyrosine hydroxylase (TH) staining to verify the level of dopaminergic lesion. Rats with less than 90% of TH depletion in the substantia nigra and striatum were excluded from the study (data not shown).

2.7. Experimental design

The first set of experiments was aimed at investigating the acute effects of FIN on LIDs in 6-OHDA-lesioned L-DOPA primed rats. After 3 weeks from the 6-OHDA injection, rats received daily L-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg, SC) treatment for 3 further weeks, so to induce stable dyskinesias. Animals were then assigned to 3 treatment subgroups with equivalent average AIMs scores, and acutely injected with vehicle (VEH, Sal/Tween80) or different doses of FIN (30–60 mg/kg, IP), 40 min prior to L-DOPA treatment (6 mg/kg plus benserazide 6 mg/kg, SC).

Similarly to the acute studies, a separate group of 6-OHDA-lesioned animals were chronically treated with L-DOPA (6 mg/kg plus benserazide 6 mg/kg, SC) for 4 weeks, and AIMs were scored until stable expression of dyskinesia was achieved. Based on AIMs score, rats were allocated into 3 different groups and daily treated with FIN at different doses (30–60 mg/kg, IP), or VEH, followed by L-DOPA (6 mg/kg plus benserazide 6 mg/kg, SC) for further 3 weeks, and then were tested for AIMs.

The following set of experiments was aimed at testing whether FIN may prevent LID development when administered 3 weeks prior to L-DOPA, or when initiated at the same time of L-DOPA treatment. Thus, a set of 6-OHDA lesioned male rats were subjected to FIN (30–60 mg/kg, IP) or VEH injection for 3 weeks before starting L-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg, SC) treatment; thereafter, co-treatment with FIN or VEH plus L-DOPA/benserazide was carried on for 24 additional days. A second group of animals received the same treatment as above, but FIN administration was initiated at the same time of L-DOPA. In both the experimental groups (pre- and co-treated groups), stepping test was conducted at the first and last day of L-DOPA administration, while AIMs were evaluated from day 2 until day 25, every third day.

In order to unravel whether the anti LID properties of FIN might be ascribed to D₁- and/or D₂/D₃ receptor pathway modulation, we investigated the acute effects of FIN (60 mg/kg) on dyskinesias induced by the selective and non-selective dopaminergic agonists apomorphine (0.1 mg/kg, SC), SKF-82958 (0.1 mg/kg, SC), ropinirole (0.2 mg/kg, SC). Animals were primed with L-DOPA for three weeks, and a baseline AIMs score was taken with each dopaminergic agonist; therefore, the day of the test, FIN or its VEH were administered 40 min prior to apomorphine, SKF, ropinirole, and AIMs were evaluated as long as dyskinesic movements were observed. One week wash-out period was allowed between each compound. The doses of the agonists were chosen based on preliminary studies, as to be sufficient to induce significant dyskinesia in our rats.

As 5AR is differently modulated by androgens in male and female rats, (Sánchez et al., 2006), the final set of experiment was aimed at

verifying the effects of FIN in non-ovariectomized female rats. Hence, a group of 6-OHDA-lesioned female rats were subjected to the same L-DOPA priming conducted for male studies, and the effect of 4 weeks of daily L-DOPA administration with or without FIN (30–60 mg/kg, IP) was evaluated on established AIMs score.

2.8. Statistical analysis

Group comparisons were performed using Student's *t* test or one-way, two-way ordinary and repeated-measure ANOVA, with time (days or min) as repeated measure. Post hoc analyses were performed using Tukey's multiple comparisons test, as appropriate. Values are presented as means \pm SEM. All analyses were performed using GraphPad Prism software, version 7.0a.

3. Results

3.1. Acute effect of FIN on established LID

Male 6-OHDA-lesioned rats were rendered dyskinetic by a daily treatment with L-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg, SC) for 3 weeks; thereafter, animals were allocated into equally dyskinetic groups ($n = 16$ – 17 /group), to receive L-DOPA alone, or in combination with FIN at two doses (30–60 mg/kg, IP). (Fig. 1). Results show that a single administration of FIN significantly attenuated LID [main effects of treatment: $F_{(2,47)} = 17.19$, $P < 0.0001$]. Post-hoc analyses revealed that FIN was effective of at the higher tested dose (VEH + LD vs FIN60 + LD, $P < 0.0001$; Tukey's test).

3.2. Effect of chronic FIN on established LID

A second group of male 6-OHDA-lesioned dyskinetic L-DOPA primed rats ($n = 10$ /group) received daily treatment with L-DOPA alone or in combination with FIN at the same two doses tested above (30–60 mg/kg, IP) for 24 days. Two-way ANOVA with repeated measures indicated a significant effect of time [$F_{(7, 189)} = 13.34$, $P < 0.0001$], treatment [$F_{(2, 27)} = 10.77$, $P < 0.001$] and time \times treatment interaction [$F_{(14, 189)} = 2.893$, $P < 0.001$]. Multiple comparisons Tukey's test

indicated that the 60 mg/kg dose significantly dampened LID from the first injection, while the lower FIN dose became effective upon prolonged administration (Fig. 2).

3.3. Effect of chronic FIN in the prevention of LID in 6-OHDA-lesioned L-DOPA-naïve male rats

Next, two separate groups of 6-OHDA-lesioned L-DOPA-naïve rats were used to test the ability of FIN to prevent development of LID when initiated either concomitantly, or before introducing the chronic L-DOPA treatment. This design was chosen to mimic a clinical situation where FIN would be administered in patients before they develop LIDs. To this aim, the first set of L-DOPA-naïve 6-OHDA-lesioned rats were concomitantly treated (40 min apart) with L-DOPA and FIN at 30 or 60 mg/kg doses (IP), or VEH for 24 days (Fig. 3A; co-treated groups, $n = 24$). The second group of 6-OHDA-lesioned L-DOPA-naïve animals was first administered FIN at 30 or 60 mg/kg doses (IP), or VEH for 3 weeks (pre-treated groups, $n = 26$); thereafter, they received L-DOPA/benserazide (6/6 mg/kg, SC) in combination with FIN or VEH for additional 24 days (Fig. 3B). As shown in Fig. 3, both FIN regimens elicited a significant reduction of AIMs [co-treated groups, main effects of treatment: $F_{(2, 21)} = 4.075$, $P < 0.05$; pre-treated groups, main effects of treatment: $F_{(2, 23)} = 10.69$, $P < 0.001$, two-way repeated measures ANOVA]. A main effect of time was also found [co-treated groups, main effects of time: $F_{(7, 147)} = 11.18$, $P < 0.001$; pre-treated groups, main effects of time: $F_{(7, 161)} = 5.76$, $P < 0.001$, two-way repeated measures ANOVA], while no treatment \times time interaction was detected by the analyses for both treatments [co-treated groups, treatment \times time interaction $F_{(14, 147)} = 0.78$, $P = 0.68$, NS; pre-treated groups, treatment \times time interaction: $F_{(14, 161)} = 0.76$, $P = 0.70$, NS, two-way repeated measures ANOVA]. Tukey's test indicated a significant effect of FIN 60 mg/kg in co-treatment ($P < 0.05$), with days 2, 8 and 25 significantly different from corresponding VEH points, and a trend for FIN 30 mg/kg (Fig. 3A). Both FIN doses were able to significantly decrease AIMs in the preventive treatment ($P < 0.01$ and $P < 0.0001$ for FIN 30 and 60 mg/kg, respectively); all time points were different from VEH (Fig. 3B).

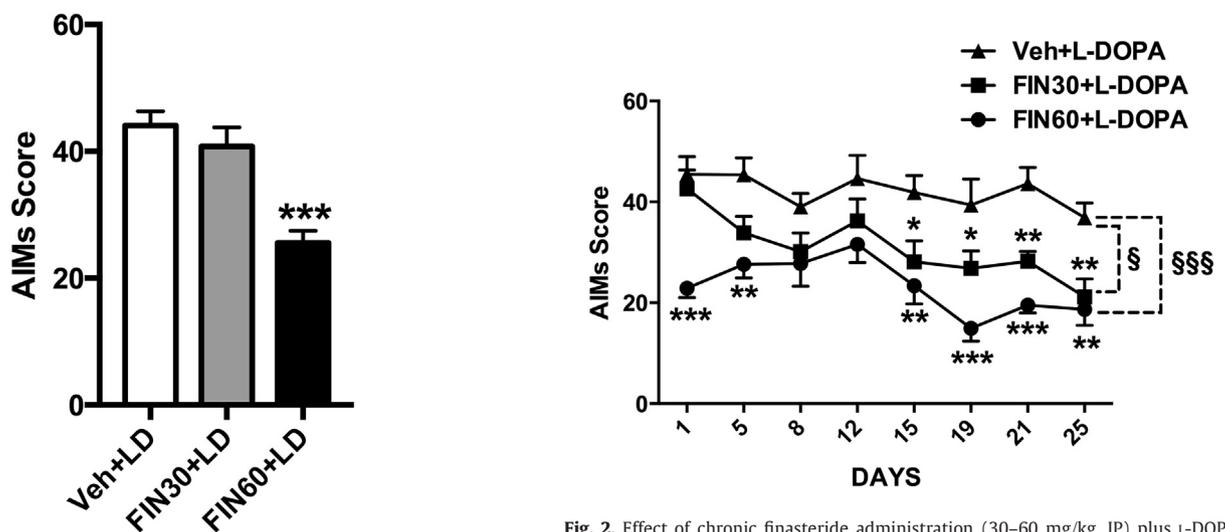


Fig. 1. Acute effect of finasteride 30 mg/kg (FIN30, $n = 16$), 60 mg/kg (FIN60, $n = 17$) or its vehicle (Veh, $n = 17$) plus L-DOPA (6 mg/kg, SC) on L-DOPA induced dyskinesias in 6OHDA-lesioned rats. Scores are shown as the sum of axial, limb and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) and represent mean \pm SEM for each experimental group. *** = $P < 0.001$ vs VEH + L-DOPA group (Tukey's multiple comparison test).

Fig. 2. Effect of chronic finasteride administration (30–60 mg/kg, IP) plus L-DOPA (6 mg/kg, SC) on L-DOPA-induced dyskinesias in 6OHDA-lesioned rats. Scores are shown as the sum of axial, limb and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) on each testing session. Values represent mean \pm SEM for each experimental group ($n = 10$ /group). Main effect of treatment, § = $P < 0.05$; §§§ = $P < 0.0001$ vs VEH + L-DOPA group (Two way ANOVA for repeated measures, followed by Tukey's test). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$ vs corresponding time point in VEH + L-DOPA group (Tukey's multiple comparison post hoc test).

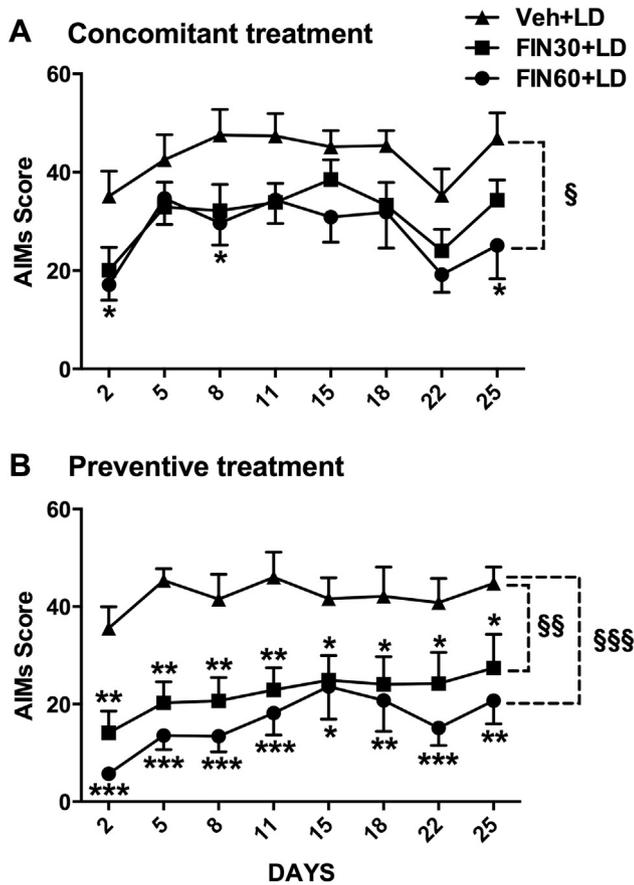


Fig. 3. Effect of concomitant (A) or preventive (B) chronic treatment with finasteride (30–60 mg/kg, IP) plus L-DOPA (6 mg/kg, SC) on L-DOPA-induced dyskinesias in 6OHDA-lesioned rats. Scores are shown as the sum of axial, limb and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) on each testing session. Values represent mean \pm SEM for each experimental group ($n = 8$ –9/group). Main effect of treatment, § = $P < 0.05$, §§ = $P < 0.01$, §§§ = $P < 0.001$ vs VEH + L-DOPA group (Two way ANOVA for repeated measures, followed by Tukey's test). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$ vs corresponding time point in VEH + L-DOPA group (Tukey's multiple comparison post hoc test).

3.4. Effect of FIN pretreatment on L-DOPA-induced forelimb use in 6-OHDA-lesioned L-DOPA-naïve rats

The above experimental groups (co-treated and pre-treated animals) were subjected to the stepping test on days 1 and 24 of chronic L-DOPA treatment, to investigate the ability of L-DOPA given with or without FIN to improve the forelimb impairment produced by the 6-OHDA lesion. Animals were previously trained in this test, and only animals with severe impairments were kept in the study. The day of the experiments, rats were first tested for the baseline impairment; then, they received FIN (30–60 mg/kg, IP) or VEH, in combination with L-DOPA (given 40 min later), and the number of adjusting steps was assessed 60 and 150 min after L-DOPA injection at day 1, and 150 min after L-DOPA at day 24 (as the animals were more dyskinetic on day 24, the test could not be performed at 60 min). Compared to baseline, L-DOPA improved the forelimb use in both experimental settings (co-treated and pre-treated groups) and test day (days 1 and 24 of treatment) (Fig. 4). Most importantly, under both experimental conditions, the lower dose of FIN did not modify the therapeutic effect of L-DOPA, neither at 60 min, nor at 150 min post L-DOPA injection at treatment day 1. Similarly, FIN 30 mg/kg did not affect the efficacy of L-DOPA at day 24 in both co-treated and pre-treated groups. By contrast, FIN 60 mg/kg significantly reduced the improvement in the forelimb use elicited by L-DOPA administration at both 60 and 150 min of treatment day 1 in

the co-treated group, whereas it did not dampen the improvement at day 24; it should be noted, however, that an unexpected improvement at baseline was seen in the co-treated group at day 24, albeit not significant. Similarly, FIN 60 mg/kg dampened the forelimb use in the pre-treated group at 60 min of the treatment day 1, but it did not reduce it at 150 min post L-DOPA, neither at treatment day 1, nor at treatment day 24.

3.5. Effect of FIN on dyskinesia induced by dopaminergic agonists

In a separate group of L-DOPA-primed dyskinetic male rats, we evaluated the antidyskinetic properties of FIN given at 60 mg/kg (IP) against dyskinesia induced by the non-selective dopaminergic agonist apomorphine, and the selective D_1 and D_2 - D_3 dopaminergic agonists SKF-82958 and ropinirole, respectively. The dose of FIN was selected as it was the only one effective on LID upon acute administration. Results show that FIN was able to counteract dyskinesias induced by all the dopaminomimetics. Unpaired, two-tailed t test indicated a significant effect of FIN on apomorphine ($t = 8.626$, $P < 0.0001$), SKF-82958 ($t = 8.932$, $P < 0.001$) and ropinirole ($t = 2.321$, $P < 0.05$) (Fig. 5).

3.6. Effect of chronic FIN on established LID in female rats

Finally, we set to investigate whether FIN may produce similar antidyskinetic effect in female 6-OHDA-lesioned rats, as observed in males. In fact, FIN has so far been a clinical target only in male subjects for the treatment of androgenic alopecia or benign prostatic hyperplasia, while dyskinesia equally affects male and female PD patients. L-DOPA-primed dyskinetic rats were used to this purpose. Similarly to the acute data, results show that chronic FIN treatment produced significant dampening of LID also in females ($n = 7$ /group) [significant main effect of treatment, $F_{(2, 18)} = 8.442$, $P < 0.01$]. Moreover, a statistical trend was found for time \times treatment interaction ($P = 0.1$). Accordingly, multiple comparisons revealed that only the higher dose of FIN (i.e., 60 mg/kg, IP) was effective in dampening LID along the chronic treatment regimen (Fig. 6).

4. Discussion

The results of the present study show for the first time that the prototypical 5AR inhibitor FIN significantly reduces development and expression of dyskinesia induced by L-DOPA in 6-OHDA-lesioned rats under different treatment regimens. Importantly, the lower dose of FIN, which produced significant dampening of AIMs (equal to the higher dose) when given as preventive treatment in male rats, did not affect the therapeutic efficacy of L-DOPA in the stepping test. Preservation of the therapeutic effect of L-DOPA is, in fact, a key point when exploring a potential antidyskinetic target.

Acute experiments in L-DOPA-primed rats indicated that the antidyskinetic effect of FIN may be exerted via modulation of both the D_1 - and D_2 / D_3 receptor pathways, which are both known to be involved in the expression of dyskinesia (Bastide et al., 2015; Cenci and Konradi, 2010; Solís et al., 2015; Sebastianutto et al., 2016). According to our previous results, the effect of FIN on ropinirole-induced dyskinesia might be ascribed to its ability to modulate DA D_3 receptor pathway, rather than DA D_2 receptors (Frau et al., 2016). At the same time, these latter results, along with the efficacy of FIN in counteracting dyskinesia induced by apomorphine, excluded a possible pre-synaptic effect of FIN (i.e. by a modulation of dopamine release from serotonin neurons).

Importantly, FIN produced significant antidyskinetic effect also in female parkinsonian rats; however, when comparing the results in the two genders, it appears that the effect of FIN was more pronounced in males, as indicated by the most effective antidyskinetic properties elicited by the lower FIN dose in this gender. Previous studies have indicated that 5AR expression and activity are finely regulated upon the influence of sex hormones (Sánchez et al., 2006). In particular, the

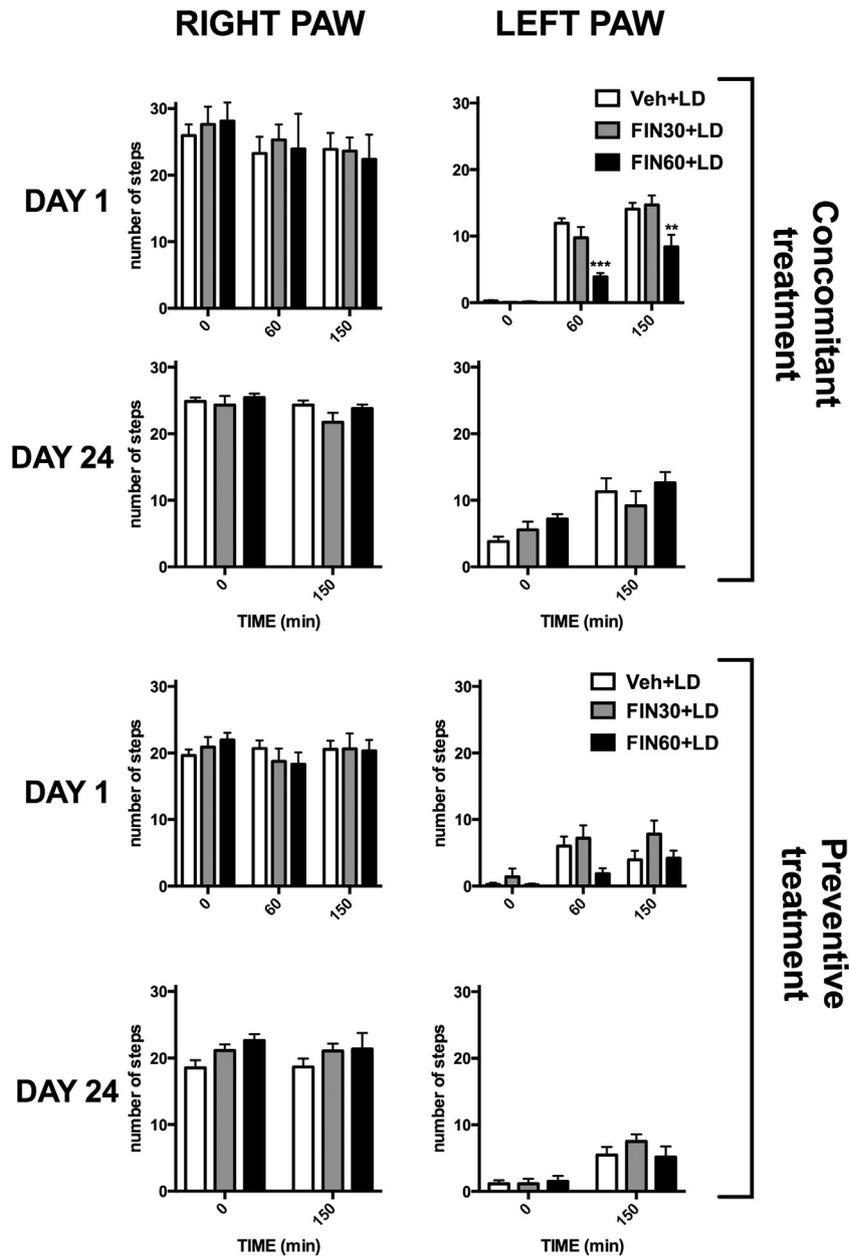


Fig. 4. Effect of concomitant or preventive chronic treatment with finasteride (30 and 60 mg/kg, IP) plus L-DOPA (6 mg/kg, SC) on L-DOPA-induced forelimb use in 6OHDA-lesioned rats. Stepping test was performed at day 1 and day 24 of L-DOPA treatment, before (time 0) and after 60 and 150 min following L-DOPA administration, as detailed in Results. Bars represent the mean number of steps \pm SEM (n = 8–9 rat/group). ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$ vs corresponding time point in L-DOPA + VEH group (Tukey's test).

expression of 5AR isoform 2 is under the positive control of testosterone, opposite to the 5AR type 1 isoform (Torres and Ortega, 2003). In addition, rats subjected to orchietomy, in which testosterone and dihydrotestosterone levels are very low, show higher 5AR 1 levels (Torres and Ortega, 2003). Although further investigations are warranted, it could be speculated that the higher FIN sensitivity observed in males may rely on a divergent expression and/or activity of the two isoforms due to different physiological levels of testosterone between genders. Moreover, we cannot exclude an influence of the estrogen levels during the estrous cycle in the lower response to the effect of FIN in females. On the other hand, male subjects would represent a more feasible target for an investigation of the effect of FIN on dyskinesia in humans, as this drug is currently used only in males (see below).

Whereas more research is needed to identify the precise mechanism by which FIN exerts its antidyskinetic effect, the hypothesis that it can negatively modulate dopaminergic transmission is also supported by our previous findings. Indeed, we have previously shown that FIN

completely reversed the behavioral alterations induced by exaggerated dopaminergic activation in rodents. Specifically, in Sprague-Dawley rats, systemic FIN injections countered the prepulse inhibition (PPI) deficits and stereotyped behaviors exerted by dopaminergic agonists, but not by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist dizocilpine (Bortolato et al., 2008). Notably, in a subsequent study we demonstrated that these behavioral effects occurred through a negative modulation of dopaminergic receptors in the striatum (Devoto et al., 2012). Furthermore, in both C57BL/6 mice and Long-Evans rats FIN was able to rescue the PPI loss mediated by selective D₁ receptor activation (Frau et al., 2013, 2016; Mosher et al., 2016). Importantly, unlike the most used anti-dopaminergic drugs, the behavioral effects of FIN were not accompanied by catalepsy, catatonia or other motor impairments.

5AR is the critical enzyme involved in neurosteroidogenesis as well as in androgens synthesis. Accordingly, the use of FIN and other 5AR inhibitor analogs in the clinical settings is based on the blockade of the conversion of testosterone into dihydrotestosterone (DHT), which has

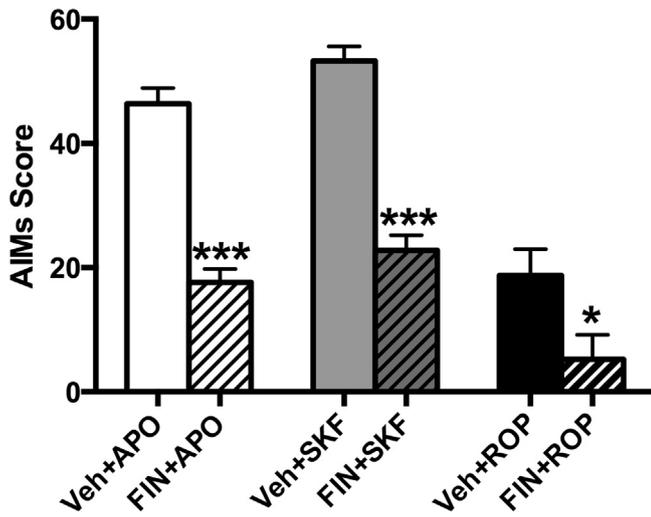


Fig. 5. Effect of acute treatment with finasteride on abnormal involuntary movements (AIMs) induced by dopaminergic agonists in L-DOPA-primed dyskinetic rats. Apomorphine (APO, 0.1 mg/kg SC, $n = 10$ each group), SKF-82958 (SKF, 0.1 mg/kg, SC, $n = 8$ each group) or ropinirole (RO, 0.2 mg/kg SC, $n = 7$ each group) were administered 40 min after finasteride (60 mg/kg, IP) or its vehicle. Scores are shown as the sum of axial, limb and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) and represent mean \pm SEM for each experimental group. * = $P < 0.05$; *** = $P < 0.001$ vs corresponding VEH + agonist group (unpaired, two-tailed Student's t test).

been shown to exert a key role in the pathogenesis of both prostatic hyperplasia and androgenic alopecia (Paba et al., 2011). We recently found that the acute administration of FIN resulted in a significant reduction of the 5AR metabolite allopregnanolone, and increase in its substrates pregnenolone and dehydroepiandrosterone in the rat striatum (Frau et al., 2015). This is of particular importance, as a wide literature suggested that these steroids might modulate dopaminergic function (Di Paolo, 1994; Sánchez et al., 2010). For instance, pregnenolone was recently shown to rescue the altered behavioral outcomes of dopamine transporter knockout mice, which mirror dopamine receptor hyperactivation in the striatum (Wong et al., 2012). Although the neurobiological underpinnings of pregnenolone are not completely understood, it acts as potent agonists of $\sigma 1$ receptors (Maurice et al., 2006), which have been shown to modulate D_1 receptor signaling (Navarro et al., 2010). Similarly, allopregnanolone and dehydroepiandrosterone sulfate modulate the behavioral effects of D_1 receptor activation (Frye et al., 2006; Dong et al., 2007), and allopregnanolone has been shown to affect the phosphorylation of DARPP-32 (Mani et al., 2000; Frye and Walf,

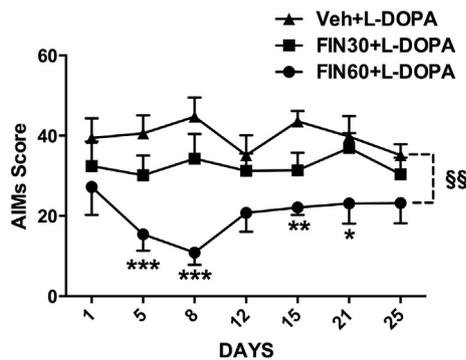


Fig. 6. Effect of chronic finasteride (30 or 60 mg/kg, IP) administration plus L-DOPA (6 mg/kg, SC) on L-DOPA-induced dyskinesias in 6OHDA-lesioned female rats. Scores are shown as the sum of axial, limb and orolingual abnormal involuntary movements (AIMs) on each testing session. Values represent mean \pm SEM for each experimental group ($n = 7$ /group). Main effect of treatment, §§ = $P < 0.01$ vs VEH + L-DOPA group (two way ANOVA for repeated measures, followed by Tukey's multiple comparison test as post hoc). * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; *** = $P < 0.001$ vs corresponding time point in VEH + L-DOPA group (Tukey's test).

2010), a key molecule in D_1 receptor signaling cascade and dyskinesia (Svenningsson et al., 2004; Picconi et al., 2003; Santini et al., 2007). Thus, the anti-dopaminergic effect of 5AR inhibitors may derive from a complex modification of the levels of several neurosteroids, which would affect striatal dopamine receptor function.

FIN has been on the market for over twenty years for the treatment of male pattern hair loss and benign prostatic hyperplasia, showing limited side effects in patients. Thus, if this drug will be demonstrated to exert beneficial effects for dyskinesia in Parkinson's patients, it may be rapidly introduced in the clinical practice, at least in male subjects. The feasibility of a clinical application is also supported by other clinical findings showing the ability of FIN to produce therapeutic effects in adult male patients affected by Tourette Syndrome (Bortolato et al., 2007; Muroi et al., 2011), a psychiatric disorder characterized by motor fluctuations and phonic tics, which pathophysiology has also been ascribed to striatal dopaminergic dysregulation (Felling and Singer, 2011; Jeffries et al., 2002; Denys et al., 2013). More importantly, FIN was also able to attenuate motor and non-motor side-effects elicited by dopamine replacement therapies in PD patients, such as blepharospasm and pathological gambling (Bortolato et al., 2010, 2012).

In conclusion, 5AR appears a feasible target in PD patients, and clinical investigations to address its effect on dyskinesia are warranted.

Acknowledgements

MC and PD were funded by the Michael J Fox Foundation (Grant ID 9969). We would like to thank Pierluigi Saba, Francesco Tracis and Barbara Tuveri for their technical assistance.

References

- Aubert, I., Guigoni, C., Håkansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B.H., Gross, C.E., Fisone, G., Bloch, B., Bezdard, E., 2005. Increased D_1 dopamine receptor signaling in levodopa-induced dyskinesia. *Ann. Neurol.* 57, 17–26.
- Bastide, M.F., Meissner, W.G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.O., Feyder, M., Francardo, V., Alcacer, C., Ding, Y., Brambilla, R., Fisone, G., Jon, Stoessl A., Bourdenx, M., Engeln, M., Navailles, S., De Deurwaerdère, P., Ko, W.K., Simola, N., Morelli, M., Groc, L., Rodriguez, M.C., Gurevich, E.V., Quik, M., Morari, M., Mellone, M., Gardoni, F., Tronci, E., Guehl, D., Tison, F., Crossman, A.R., Kang, U.J., Steece-Collier, K., Fox, S., Carta, M., Cenci, M.A., Bézard, E., 2015. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 132, 96–168.
- Berthet, A., Bezdard, E., 2009. Dopamine receptors and L-dopa-induced dyskinesia. *Parkinsonism Relat. Disord.* 15, S8–12.
- Bortolato, M., Muroi, A., Marrosu, F., 2007. Treatment of Tourette's syndrome with finasteride. *Am. J. Psychiatry* 164, 1914–1915.
- Bortolato, M., Frau, R., Orrù, M., Bourou, Y., Marrosu, F., Mereu, G., Devoto, P., Gessa, G.L., 2008. Antipsychotic-like properties of 5- α -reductase inhibitors. *Neuropsychopharmacology* 33, 3146–3156.
- Bortolato, M., Cannas, A., Solla, P., Puligheddu, M., Muroi, A., Marrosu, F., 2010. Treatment of benign essential blepharospasm with finasteride: a case report. *Clin. Neuropharmacol.* 33, 207–208.
- Bortolato, M., Cannas, A., Solla, P., Bini, V., Puligheddu, M., Marrosu, F., 2012. Finasteride attenuates pathological gambling in patients with Parkinson disease. *J. Clin. Psychopharmacol.* 32, 424–425.
- Cenci, M.A., Konradi, C., 2010. Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Prog. Brain Res.* 183, 209–233.
- Cenci, M.A., Lundblad, M., 2007. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Curr. Protoc. Neurosci. Chapter 9* (Unit 9.25).
- Denys, D., de Vries, F., Cath, D., Figeet, M., Vulink, N., Veltman, D.J., van der Doef, T.F., Boellaard, R., Westenberg, H., van Balkom, A., Lammertsma, A.A., van Berckel, B.N., 2013. Dopaminergic activity in Tourette syndrome and obsessive-compulsive disorder. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 23, 1423–1431.
- Devoto, P., Frau, R., Bini, V., Pillolla, G., Saba, P., Flore, G., Corona, M., Marrosu, F., Bortolato, M., 2012. Inhibition of 5 α -reductase in the nucleus accumbens counters sensorimotor gating deficits induced by dopaminergic activation. *Psychoneuroendocrinology* 37, 1630–1645.
- Di Paolo, T., 1994. Modulation of brain dopamine transmission by sex steroids. *Rev. Neurosci.* 5, 27–41.
- Dong, L.Y., Cheng, Z.X., Fu, Y.M., Wang, Z.M., Zhu, Y.H., Sun, J.L., Dong, Y., Zheng, P., 2007. Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulfate enhances spontaneous glutamate release in rat prelimbic cortex through activation of dopamine D_1 and sigma-1 receptor. *Neuropharmacology* 52, 966–974.
- Felling, R.J., Singer, H.S., 2011. Neurobiology of Tourette syndrome: current status and need for further investigation. *J. Neurosci.* 31, 12387–12395.

- Feyder, M., Bonito-Oliva, A., Fisone, G., 2011. ι -DOPA-induced dyskinesia and abnormal signaling in striatal medium spiny neurons: focus on dopamine D1 receptor-mediated transmission. *Front. Behav. Neurosci.* 24, 65–71.
- Fiorentini, C., Savoia, P., Savoldi, D., Bono, F., Busi, C., Barbon, A., Missale, C., 2016. Shp-2 knockdown prevents ι -dopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 31, 512–520.
- Frau, R., Pillolla, G., Bini, V., Tambaro, S., Devoto, P., Bortolato, M., 2013. Inhibition of 5α -reductase attenuates behavioral effects of D1-, but not D2-like receptor agonists in C57BL/6 mice. *Psychoneuroendocrinology* 38, 542–551.
- Frau, R., Abbiati, F., Bini, V., Casti, A., Caruso, D., Devoto, P., Bortolato, M., 2015. Targeting neurosteroid synthesis as a therapy for schizophrenia-related alterations induced by early psychosocial stress. *Schizophr. Res.* 168, 640–648.
- Frau, R., Mosher, L.J., Bini, V., Pillolla, G., Pes, R., Saba, P., Fanni, S., Devoto, P., Bortolato, M., 2016. The neurosteroidogenic enzyme 5α -reductase modulates the role of D1 dopamine receptors in rat sensorimotor gating. *Psychoneuroendocrinology* 63, 59–67.
- Frye, C.A., Walf, A.A., 2010. Infusions of anti-sense oligonucleotides for DARPP-32 to the ventral tegmental area reduce effects of progesterone- and a dopamine type 1-like receptor agonist to facilitate lordosis. *Behav. Brain Res.* 206, 286–292.
- Frye, C.A., Walf, A.A., Petralia, S.M., 2006. Progestins' effects on sexual behaviour of female rats and hamsters involving D1 and GABA(A) receptors in the ventral tegmental area may be G-protein-dependent. *Behav. Brain Res.* 172, 286–293.
- Jeffries, K.J., Schooler, C., Schoenbach, C., Herscovitch, P., Chase, T.N., Braun, A.R., 2002. The functional neuroanatomy of Tourette's syndrome: an FDG PET study III: functional coupling of regional cerebral metabolic rates. *Neuropsychopharmacology* 27, 92–104.
- Litim, N., Bourque, M., Al, Sweidi S., Morissette, M., Di Paolo, T., 2015. The 5α -reductase inhibitor dutasteride but not finasteride protects dopamine neurons in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology* 97, 86–94.
- Litim, N., Morissette, M., Di Paolo, T., 2016. Neuroactive gonadal drugs for neuroprotection in male and female models of Parkinson's disease. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 67, 79–88.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M.A., 2002. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 15, 120–132.
- Mani, S.K., Fienberg, A.A., O'Callaghan, J.P., Snyder, G.L., Allen, P.B., Dash, P.K., Moore, A.N., Mitchell, A.J., Bibb, J., Greengard, P., O'Malley, B.W., 2000. Requirement for DARPP-32 in progesterone-facilitated sexual receptivity in female rats and mice. *Science* 287, 1053–1056.
- Maurice, T., Grégoire, C., Espallergues, J., 2006. Neuro(steroid) actions at the neuromodulatory sigma1 (σ_1) receptor: biochemical and physiological evidences, consequences in neuroprotection. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 84, 581–597.
- Mosher, L.J., Frau, R., Pardu, A., Pes, R., Devoto, P., Bortolato, M., 2016. Selective activation of D(1) dopamine receptors impairs sensorimotor gating in Long-Evans rats. *Br. J. Pharmacol.* 173, 2122–2134.
- Muroni, A., Paba, S., Puligheddu, M., Marrosu, F., Bortolato, M., 2011. A preliminary study of finasteride in Tourette syndrome. *Mov. Disord.* 26, 2146–2147.
- Navarro, G., Moreno, E., Aymerich, M., Marcellino, D., McCormick, P.J., Mallol, J., Cortés, A., Casadó, V., Canela, E.I., Ortiz, J., Fuxe, K., Lluis, C., Ferré, S., Franco, R., 2010. Direct involvement of sigma-1 receptors in the dopamine D1 receptor-mediated effects of cocaine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 18676–18681.
- Paba, S., Frau, R., Godar, S.C., Devoto, P., Marrosu, F., Bortolato, M., 2011. Steroid 5α -reductase as a novel therapeutic target for schizophrenia and other neuropsychiatric disorders. *Curr. Pharm. Des.* 17, 151–167.
- Paxinos, G., Watson, C., 2007. *The rat brain in stereotaxic. Coordinates*, sixth ed. Academic Press.
- Picconi, B., Centonze, D., Håkansson, K., Bernardi, G., Greengard, P., Fisone, G., Cenci, M.A., Calabresi, P., 2003. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in ι -DOPA-induced dyskinesia. *Nat. Neurosci.* 6, 501–506.
- Sánchez, P., Torres, J.M., Del Moral, R.G., Ortega, E., 2006. Effects of testosterone on brain mRNA levels of steroid 5α reductase isozymes in early postnatal life of rat. *Neurochem. Int.* 49, 626–630.
- Sánchez, M.G., Bourque, M., Morissette, M., Di Paolo, T., 2010. Steroids-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. *CNS Neurosci. Ther.* 16, e43–e71.
- Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.A., Hervé, D., Greengard, P., Fisone, G., 2007. Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in ι -DOPA-induced dyskinesia. *J. Neurosci.* 27, 6995–7005.
- Sebastianutto, I., Maslava, N., Hopkins, C.R., Cenci, M.A., 2016. Validation of an improve scale for rating ι DOPA-induced dyskinesia in the mouse and effects of specific dopamine receptor antagonists. *Neurobiol. Dis.* 96, 156–170.
- Solís, O., García-Montes, J.R., González-Granillo, A., Xu, M., Moratalla, R., 2015. Dopamine D3 receptor modulates ι -DOPA-induced dyskinesia by targeting D1 receptor-mediated striatal signaling. *Cereb. Cortex* (pii: bhv231. [Epub ahead of print]).
- Svenningsson, P., Nishi, A., Fisone, G., Girault, J.A., Nairn, A.C., Greengard, P., 2004. DARPP-32: an integrator of neurotransmission. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 269–296.
- Torres, J.M., Ortega, E., 2003. Differential regulation of steroid 5α reductase isozymes expression by androgens in the adult rat brain. *FASEB J.* 17, 1428–1433.
- Tronci, E., Shin, E., Björklund, A., Carta, M., 2012. Amphetamine-induced rotation and ι -DOPA-induced dyskinesia in the rat 6-OHDA model: a correlation study. *Neurosci. Res.* 73, 168–172.
- Tronci, E., Lisci, C., Stancampiano, R., Fidalgo, C., Collu, M., Devoto, P., Carta, M., 2013. 5-Hydroxy-tryptophan for the treatment of ι -DOPA-induced dyskinesia in the rat Parkinson's disease model. *Neurobiol. Dis.* 60, 108–114.
- Tronci, E., Fidalgo, C., Zianni, E., Collu, M., Stancampiano, R., Morelli, M., Gardoni, F., Carta, M., 2014. Effect of memantine on ι -DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 265, 245–252.
- Westin, J.E., Vercammen, L., Strome, E.M., Konradi, C., Cenci, M.A., 2007. Spatiotemporal pattern of striatal ERK1/2 phosphorylation in a rat model of ι -DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biol. Psychiatry* 62, 800–810.
- Wong, P., Chang, C.C., Marx, C.E., Caron, M.G., Wetsel, W.C., Zhang, X., 2012. Pregnenolone rescues schizophrenia-like behavior in dopamine transporter knockout mice. *PLoS One* 7, e51455.