**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Fisiologia**

**ANÁLISE DE FATORES INFLAMATÓRIOS NA DISCINESIA
INDUZIDA POR L-DOPA EM MODELO DE CAMUNDONGOS:
CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CICLOOXIGENASE-2**

MAURÍCIO DOS SANTOS PEREIRA

**Ribeirão Preto
2017**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA**

MAURÍCIO DOS SANTOS PEREIRA

**ANÁLISE DE FATORES INFLAMATÓRIOS NA DISCINESIA
INDUZIDA POR L-DOPA EM MODELO DE CAMUNDONGOS:
CARACTERIZAÇÃO DA ENZIMA CICLOOXIGENASE 2.**

**RIBEIRÃO PRETO
2017**

MAURÍCIO DOS SANTOS PEREIRA

Análise de fatores inflamatórios na discinesia induzida por L-DOPA em modelo de camundongos: caracterização da enzima Ciclooxygenase 2.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como requisito para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Área de concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

dos-Santos-Pereira, Maurício

Análise de fatores inflamatórios na discinesia induzida por L-DOPA em modelo de camundongos: caracterização da enzima ciclooxigenase 2.

Ribeirão Preto, 2017.

254 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Del Bel, Elaine.

1. Discinesia induzida por L-DOPA. 2. Neuroinflamação. 3. COX-2 4. Doença de Parkinson. 5. Citocinas. 6. NF- κ B.

Trabalho realizado no Laboratório de Neurofisiologia Molecular, Departamento de Fisiologia do Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade São Paulo - USP, sob a orientação da Professora Dra. Elaine Del Bel.

Nome: DOS-SANTOS-PEREIRA, Maurício

Título: Análise de fatores inflamatórios na discinesia induzida por L-DOPA em modelo de camundongos: caracterização da enzima ciclooxigenase 2.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto como requisito para obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães
Universidade de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Alinne Cristina de Campos
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco
Universidade de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Lúcia Helena Faccioli
Universidade de São Paulo

Dr.^a Rita Raisman-Vozari
Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière

***“Quando recebemos um ensinamento,
devemos receber como um valioso presente
e não como dura tarefa.
Eis aqui a diferença que transcende”.***

Albert Einstein

À minha mãe,

ao meu pai

e ao meu irmão.

Ao meu companheiro
e melhor amigo.

AGRADECIMENTOS

São nos momentos em que não conseguimos enxergar o que vem a frente que olhamos para os lados e vemos quem está lá. Servindo como nossos olhos, ouvidos e voz. Esse espacinho no meio de toda a tese vai para vocês, que merecem um espaço infinitamente maior. Que ocupam um espaço infinitamente maior.

Eu nunca sei como começar a escrever isso. Talvez o ideal seja começar agradecendo Àquele que me mostra dia a dia que, apesar das dificuldades, no fim sempre vale à pena. Àquele que me mostrou que sem esforço, sem pedras no caminho, o aprendizado não seria bem aproveitado. Obrigado por ter me permitido chegar até aqui e por ter posto em minha vida pessoas que permitiram que meu caminho não fosse solitário.

Minha mãe. A mulher mais forte do mundo, mesmo sem saber. Meu eterno porto seguro. A você que me ensinou a ver o mundo com olhos de bondade. Que me fez acreditar sempre no melhor das pessoas, e sempre tentar dar o meu melhor a elas, independente do que eu receba em resposta. A você, de quem eu tenho tanto orgulho por ter se sacrificado tanto por aqueles que ama, inclusive por mim. Eu queria ser só metade do ser humano que você é. E eu te amo tanto que você não faz ideia.

Meu irmão. Que mesmo com tantas desavenças, é meu maior protetor nesse mundo. Que de um tempo para cá se tornou um pouco meu pai. Que reclama e implica comigo, e que sempre arranjaria motivo para fazê-lo, porque senão não seria a gente.

Meu companheiro. Meu melhor amigo. Aquele que chegou e quando eu percebi, já tinha ficado. E que... eu não posso deixar mais ir. Você tem sido o melhor em todos os sentidos. Obrigado por me deixar fazer parte da sua vida. Obrigado por sempre comprar minha briga. E por ser tão paciente. Esse é um dos primeiros ciclos que se encerra com você ao meu lado e comigo ao seu. Rumo a todos os outros!

Minha chefe. Aquela que me acolheu quando eu achava que sabia um pouco e no final me mostrou que eu não sei nada. Aquela que me abriu portas para a ciência e para o mundo. E me mostrou que tem tanto mais a ser visto, a ser aprendido, a ser discutido. Obrigado por ter me recebido mesmo sem me conhecer e ter me ensinado um pouco a cada dia. Acredito que o principal tenha sido que eu não posso me contentar. Tem sempre algo a ser aprendido e melhorado. Espero um dia corresponder às suas expectativas.

Meus amigos, minhas pilastras. Aqueles que formam a base sólida da minha vida. Aos que vieram no bolso de lá do Rio e aos que adquiri aqui. A vocês que não são em quantidade, mas em qualidade. Posso garantir aqui que tenho os melhores amigos do mundo. Aqueles que me ouvem reclamar de tudo, me dão conselhos, brigam comigo e mais que tudo, me dão um valor inestimável, me fazem acreditar que sou único.

Aqueles que estão comigo nos melhores e nos piores dias. Seja por uma conversa, uma mensagem, uma carona, um abraço. Coisas que para mim fazem toda a diferença do mundo. Vocês são pessoas sem as quais nada disso faria sentido. Digo aqui que tudo o que faço é por vocês e para vocês. Em prol de um futuro com vocês por perto. Obrigado por terem me guiado até aqui, por meio de conversas e conselhos. Todas as partes boas e ruins serviram e continuarão a servir como aprendizado. Não apenas científico, mas de vida. De como me tornar um melhor cientista e um melhor ser humano.

Ao meu Lab! Vocês estão na categoria de cima, mas merecem um destaque a mais. Meus companheiros do dia-a-dia, que estão lá para me fazer sentir o gosto bom de trabalhar. Aqueles que riem comigo frente a alguma besteira, que xingam comigo quando um experimento não dá certo de jeito nenhum, que conversam comigo, bem... o tempo todo. E que me ensinam muito, de várias formas. Afinal, é assim que se faz ciência, não é? Meu agradecimento a essa família que se formou e que eu espero que exista sempre, independente do que será feito de cada um. A todos os que ainda me aturam ao longo desses quatro anos, e aos foram saindo aos pouquinhos, mas que deixam muitas saudades.

Muito, muitíssimo obrigado pelos momentos que me fizeram e fazem feliz. Obrigado por terem feito questão de me provar errado quando acreditei que em ambiente de pesquisa, trabalhar com alegria e leveza é um luxo. Espero que vocês se reconheçam aqui. Obrigado pelas conversas dentro do carro em direção ao bandeirão e pelos fins de semana que mesmo trabalhando, a gente se divertia; pela carona até a USP, com as várias conversas e os vários conselhos; pela discussão de séries e filmes (principalmente da Marvel) na hora do almoço; pelos groupons e jantares no Cabaña ao som de malandramente. Pelas discussões e decisões de desenhos experimentais e até mesmo pelas conversas constrangedoras que fazem todos no lab rir; pelo abraço e pelos “querido” que ouvi durante esse tempo. Pelos almoços em que vocês abriram suas casas para mim e pelos momentos espontâneos para fotos forjadas. Pelas ajudas com os experimentos que não saíam de jeito nenhum e pela oportunidade não só de

aprender, mas de me deixar ensinar um pouco do que aprendi nos últimos anos. Pelos bolos e fotos. Pelos aniversários no Villa. E pelos abraços! Obrigado pelos abraços a cada manhã.

À tous mes amis français/argentins! Ce qui m'a bien accueilli pendant ma période à Paris. Aux personnes qui ont fait de mon temps en France une expérience incroyable. Et les patrons, avec qui c'était un plaisir de travailler et me faire envie d'être parisien encore une fois. Pour tous ceux qui faisaient partie de ce chapitre, je vous remercie pour tout! J'espère revenir bientôt! PS: Pardonnez-moi pour les erreurs de grammaire, ok?

Ao departamento de Fisiologia, principalmente na forma de suas secretárias. Que tinham tamanha preocupação a ponto de me ligarem diversas vezes para avisar sobre pendências que eu tinha mais que obrigação de saber. Que colaboraram meu engrandecimento científico me permitindo levar meu trabalho para fora. Que me salvaram tantas vezes em momentos de necessidade. Obrigado pelo carinho e paciência que têm comigo. Esse departamento não existe sem vocês. E aos professores que me encantaram com seu conhecimento, que me mostraram um mundo que eu venho descobrindo e amando a cada dia mais. Obrigado por terem dividido comigo o conhecimento que possuem, espero fazer jus ao nome da USP.

Ao meu Lab do Rio! Fisicamente eu estou longe, mas em pensamento e carinho, eu nunca saí do lugar. A todos vocês que estão sempre em contato, me querendo por perto e torcendo por mim. Que de vez em quando pedem para eu “arranjar um experimento no Rio” só para poder passar um tempo aí matando as saudades. Que torcem por mim como se todas as minhas vitórias fossem suas. E que mesmo de longe, me dão conselhos sobre a vida, tanto científica e acadêmica quanto pessoal, e que sempre terminam sua frase com “quando quiser voltar, seu lugar cativo te espera!”. É muito bom saber que ainda ocupo um “lugar cativo”.

A todos aqueles que agora não me vêm à cabeça, mas que de um jeito ou de outro colaboraram, com um ato pequeno, mas sem o qual eu não estaria onde estou.

E ao meu pai. Que seu rosto não apague da minha memória, que onde você esteja, seja um lugar absurdamente melhor que aqui. Sem seu apoio nada, NADA disso seria possível. Você foi o melhor pai que alguém poderia ter. Muito obrigado por tudo. Eu te amo e sinto saudades.

RESUMO

DOS-SANTOS-PEREIRA, Maurício. **Análise de fatores inflamatórios na discinesia induzida por L-DOPA em modelo de camundongos: caracterização da enzima ciclooxigenase 2**. 2017. 278 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa que mais atinge a população mundial. O desenvolvimento dos prejuízos motores decorrentes da doença está relacionado a sua fisiopatologia, que promove principalmente a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta*. Estudos sugerem o envolvimento de vias inflamatórias exacerbando a morte celular na fisiopatologia da DP. O fenômeno neuroinflamatório é caracterizado pela ativação de diversas células do sistema nervoso central, como neurônios, micróglia e astrócitos, além dos principais mediadores pró-inflamatórios, que são a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), a interleucina 1 β (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6), entre outros. Estes fatores estão presentes em estruturas neuroanatômicas como o estriado e substância negra *pars compacta* de indivíduos com a DP. O tratamento crônico com L-DOPA, o precursor do neurotransmissor dopamina, inicialmente gera uma redução da manifestação dos sintomas motores na maioria dos pacientes. Porém, após certo tempo de tratamento, ocorre o surgimento de complicações motoras, como a discinesia induzida por L-DOPA (LID – *L-DOPA-induced dyskinesia*). O desenvolvimento e a manifestação da LID também podem acompanhar uma resposta inflamatória anormal. Dados do grupo sugerem a enzima COX-2 e as células gliais como mediadores da LID. Estudos apontam que fármacos que reduzem a LID modulam a expressão de COX-2. Nosso objetivo, portanto, foi caracterizar a presença de fatores/mecanismos pró-inflamatórios no estriado lesionado de camundongos tratados com L-DOPA. Nossos resultados serão apresentados em três capítulos. No primeiro capítulo, empregamos o modelo de camundongos hemiparkinsonianos (lesionados com 6-hidroxidopamina) e tratamos com L-DOPA por diferentes períodos de tempo (1, 7, 14 e 21 dias) para analisarmos o surgimento de fatores inflamatórios no estriado, como a enzima COX-2, o fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e a expressão e atividade dos astrócitos e micróglia. No segundo capítulo, demonstramos o potencial destas células gliais em produzir citocinas e/ou glutamato após estímulo com os principais neurotransmissores envolvidos com a LID, a DA (ou seu precursor L-DOPA) e glutamato. No terceiro capítulo, demonstramos o potencial terapêutico de drogas usadas na clínica - com propriedades anti-inflamatórias - de reduzirem a LID previamente estabelecida. Para tal, utilizamos o canabidiol (princípio ativo da *Cannabis*, usado no tratamento para epilepsia, entre outros) e o celecoxibe (inibidor específico da atividade enzimática da COX-2). Este estudo corrobora a existência de um processo inflamatório no estriado lesionado de camundongos parkinsonianos, exacerbado pelo tratamento com L-DOPA. A enzima COX-2 pode ter um papel fundamental no desenvolvimento da LID. Adicionalmente, este trabalho sugere que drogas utilizadas clinicamente com ação anti-inflamatória podem se tornar possíveis ferramentas terapêuticas para a redução desta desordem. Desta forma, relacionamos a produção de fatores inflamatórios e a ativação de células gliais à perpetuação de uma atividade pós-sináptica estriatal anormal que ocasionam a “má plasticidade” típica da LID.

Palavras-chave: Discinesia induzida por L-DOPA; neuroinflamação; COX-2; doença de Parkinson; citocinas; NF- κ B.

ABSTRACT

DOS-SANTOS-PEREIRA, Maurício. **Analysis of inflammatory factors in L-DOPA-induced dyskinesia in a mouse model: characterization of the enzyme cyclooxygenase 2.** 2017. 278 f. Thesis (Ph.D. in Physiology) – Medicine School of Ribeirão Preto, São Paulo University, São Paulo, 2017.

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in world population. The development of motor impairments related to this disease occurs due to its pathophysiology, which mainly promotes the neurodegeneration of the dopaminergic neurons in the *substantia nigra pars compacta*. Studies suggest the involvement of inflammatory pathways that exacerbate cell death in the pathophysiology of PD. The neuroinflammatory phenomenon is characterized by the activation of central nervous system cells, such as neurons, microglia and astrocytes, in addition to proinflammatory mediators that are elevated in patients with PD, such as the enzyme cyclooxygenase-2 (COX-2), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), interleukin 1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6), among others. These factors are present in neuroanatomic structures such as striatum and *substantia nigra pars compacta*. Chronic treatment with L-DOPA, the precursor of the neurotransmitter dopamine, initially generates a reduction in the manifestation of motor symptoms in the vast majority of patients, but after a certain time of treatment, motor complications begin to appear, such as L-DOPA-induced dyskinesia (LID). The development and manifestation of LID may also accompany an abnormal inflammatory response. Data from our group suggest the enzyme COX-2 as one of the mediators of LID. Studies also point out that drugs that reduce LID are able to modulate COX-2 expression. Our objective, therefore, was to characterize the presence of proinflammatory factors/mechanisms in the injured striatum of mice treated with L-DOPA. For this purpose, the present study will be divided into three chapters. In the first chapter, we used the hemiparkinsonian mice model (lesioned with 6-hydroxydopamine) treated with L-DOPA for different time periods (1, 7, 14 and 21 days) to observe the appearance of inflammatory factors in the striatum, such as the COX-2 enzyme, nuclear factor kappa-B (NF- κ B) and the expression and activity of glial cells, represented by astrocytes and microglia. In the second chapter, we demonstrated the potential of glial cells to produce cytokines and/or glutamate after stimulation with the major neurotransmitters involved with LID, dopamine (or its precursor L-DOPA) and glutamate. Finally, in the third chapter, we demonstrate the therapeutic potential of drugs used in the clinic with anti-inflammatory properties to reduce previously established LID. For this, we used cannabidiol (the active constituent of *Cannabis*, used for the treatment of epilepsy, among others) and celecoxib (a specific COX-2 activity inhibitor). The present study corroborates the existence of an inflammatory process in the injured striatum of parkinsonian mice, exacerbated by treatment with L-DOPA. The COX-2 enzyme may play a key role in the development of LID. Additionally, this work suggests that drugs clinically used with anti-inflammatory action may become possible therapeutic tools for the reduction of this disorder. In this way, we relate the production of inflammatory factors and the activation of glial cells to the perpetuation of an abnormal striatal postsynaptic activity that causes the "maladaptive plasticity" typical of LID.

Keywords: L-DOPA-induced dyskinesia; neuroinflammation; COX-2; Parkinson's disease; cytokines; NF- κ B

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Via de síntese, armazenamento, liberação, estímulo, recaptção e degradação de catecolaminas. **Pág. 32**
- Figura 2:** Estruturas encefálicas de ação dopaminérgica e suas principais vias no Sistema Nervoso Central. **Pág. 33**
- Figura 3:** Estruturas dos núcleos da base. **Pág. 34**
- Figura 4:** Caracterização fisiológica da via direta. **Pág. 36**
- Figura 5:** Caracterização fisiológica da via indireta. **Pág. 37**
- Figura 6:** Fotomicrografias da SNpc em paciente com DP mostrando corpos e neuritos de Lewy. **Pág. 40**
- Figura 7:** Modificações em fatores relacionados à inflamação no encéfalo de pacientes parkinsonianos. **Pág. 48**
- Figura 8:** Possíveis mecanismos propostos para as consequências deletérias do processo neuroinflamatório na DP. **Pág. 51**
- Figura 9:** Cascata do ácido araquidônico e produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos a partir das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase. **Pág. 54**
- Figura 10:** Produção de prostaglandinas pela COX e suas diversas funções no organismo. **Pág. 55**
- Figura 11:** Mecanismos envolvidos na neurodegeneração dependentes da ativação de COX-2. **Pág. 59**
- Figura 12:** Categorias de AIMs em camundongos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA. **Pág. 69**
- Figura 13:** Regiões e áreas analisadas do estriado de camundongos. **Pág. 71**
- Figura 14:** Linha temporal de tratamento com L-DOPA por diferentes dias. **Pág. 74**
- Figura 15:** Linha temporal de tratamento com canabinóides. **Pág. 78**
- Figura 16:** Linha temporal de tratamento com inibidores de COX. **Pág. 79**
- Figura 17:** Análise da curva temporal do tratamento com L-DOPA na manifestação de AIMs. **Pág. 87**

Figura 18: Expressão da enzima TH na região rostral do estriado.	Pág. 88
Figura 19: Expressão de TH na região medial do estriado.	Pág. 89
Figura 20: Expressão de TH na região caudal do estriado.	Pág. 90
Figura 21: Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo em diferentes posições relativas ao bregma ilustrando a perda de fibras TH+ no estriado.	Pág. 91
Figura 22: Correlação entre a intensidade da lesão e os níveis de LID.	Pág. 92
Figura 23: Quantificação de células FosB+ na área lateral do estriado lesionado após tratamento com L-DOPA.	Pág. 94
Figura 24: Quantificação de células COX-2+ no estriado lesionado após tratamento com L-DOPA.	Pág. 96
Figura 25: Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TH, FosB e COX-2 em camundongos tratados com L-DOPA (21 dias).	Pág. 97
Figura 26: Fotomicrografias representativas da colocalização entre a enzima TH e a enzima COX-2.	Pág. 98
Figura 27: Correlação entre a manifestação da LID e o número de células COX-2+ na área dorsolateral do estriado lesionado.	Pág. 99
Figura 28: Colocalização de COX-2 estriatal com neurônios (NeuN), astrócitos (GFAP) ou células microgliais (Iba-1) no estriado lesionado de camundongos tratados cronicamente com L-DOPA.	Pág. 100
Figura 29: Produção de PGE ₂ no estriado lesionado após tratamento com L-DOPA.	Pág. 101
Figura 30: Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre a expressão do gene de resposta imediata NF-κB.	Pág. 102
Figura 31: Análise de células GFAP+ no estriado de camundongos lesionados tratados com L-DOPA.	Pág. 103
Figura 32: Quantificação de GFAP na área lateral do estriado lesionado.	Pág. 104
Figura 33: Fotomicrografias representativas da imunomarcação para GFAP.	Pág. 106
Figura 34: Análise de células Iba-1+ no estriado de camundongos lesionados tratados com L-DOPA.	Pág. 108
Figura 35: Quantificação de micróglia reativa na área lateral do estriado lesionado.	Pág. 110

Figura 36: Fotomicrografias representativas da imunomarcação para Iba-1 e caracterização de seu estado reativo.	Pág. 111
Figura 37: Análise do efeito da L-DOPA/DA sobre a ativação de astrócitos.	Pág. 122
Figura 38: Análise do efeito do glutamato sobre a ativação de astrócitos.	Pág. 123
Figura 39: Análise do efeito da L-DOPA/DA sobre a ativação de micróglia.	Pág. 125
Figura 40: Análise do efeito do glutamato sobre a ativação de micróglia.	Pág. 126
Figura 41: Efeito individual do CBD e após a coadministração com o antagonista TRPV-1 CPZ sobre os AIMs estabelecidos por L-DOPA.	Pág. 142
Figura 42: Efeito do AA-5-HT (inibidor da FAAH e antagonista TRPV-1) sobre os AIMs estabelecidos por L-DOPA.	Pág. 143
Figura 43: Efeito do AM251 (antagonista CB ₁) na redução de AIMs causada pela coadministração de CPZ+CBD.	Pág. 145
Figura 44: Efeito do GW9662 (antagonista PPAR-gama), na redução de AIMs induzida por CPZ+CBD.	Pág. 147
Figura 45: Efeito da coadministração de CPZ+CBD em fibras TH+.	Pág. 149
Figura 46: Efeito de CPZ+CBD sobre a expressão de p-Ach3 e p-ERK após o tratamento com L-DOPA.	Pág. 151
Figura 47: Efeito de CPZ+CBD sobre COX-2 e NF-κB no estriado lesionado de camundongos.	Pág. 153
Figura 48: Influência do pré-tratamento com CPZ+CBD sobre a produção de PGE ₂ no estriado lesionado de animais discinéticos.	Pág. 154
Figura 49: Efeito dos inibidores de COX Celec e Indo sobre os AIMs estabelecidos por L-DOPA.	Pág. 157
Figura 50: Análise do tratamento com Celec sobre a expressão de TH, FosB e COX-2 no estriado lesionado.	Pág. 159
Figura 51: Influência do pré-tratamento com Celec sobre a produção de PGE ₂ no estriado lesionado de animais discinéticos.	Pág. 160
Figura 52: Possíveis mecanismos de síntese de COX-2 como gene de resposta imediata/modulador da atividade neuronal a longo prazo.	Pág. 174
Figura 53: Ação da α-sin _f sobre os níveis de glutamato, número de células DAPI+ e morfologia da micróglia.	Pág. 183

Figura 54: Envolvimento dos receptores P2X7 e TLR2 nos níveis de glutamato extracelular induzidos por α -sin_f. **Pág. 185**

Figura 55: Efeito dos antioxidantes TROL, APO e DPI sobre o aumento extracelular de glutamato induzido por α -sin_f. **Pág. 186**

Figura 56: Dependência do transportador xCT no transporte de glutamato aumentado pela α -sin_f. **Pág. 188**

Figura 57: Efeito da DA sobre os níveis aumentados de glutamato extracelular e sua via de sinalização. **Pág. 190**

Figura 58: Ação da DA na produção de ROS e expressão de NOX2. **Pág. 191**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Protocolo padrão para administração de fármacos. **Pág. 76**

Tabela 2: Produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 em astrócitos e micróglia após tratamento com L-DOPA, DA e glutamato. **Pág. 127**

Tabela 3: Expressão de GFAP e Iba-1 no estriado lateral lesionado após o tratamento com Celec e CPZ+CBD em camundongos previamente tratados com L-DOPA. **Pág. 161**

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Mecanismo proposto mostrando como a neuroinflamação desencadeia a LID e como drogas anti-inflamatórias modificam a sinalização inflamatória. **Pág. 178**

Esquema 2: Desenho esquemático mostrando como a da poderia prevenir a liberação de glutamato induzida por α -sin_f em células microgliais. **Pág. 194**

MATERIAL SUPLEMENTAR

Material Suplementar 1: Análise comportamental para identificação da intensidade da lesão.

Pág. 203

Material Suplementar 2: Colocalização de COX-2 estriatal com neurônios (NeuN) no estriado lesionado de camundongos tratados cronicamente com L-DOPA visualizada pela técnica de imunistoquímica colorimétrica.

Pág. 204

Material Suplementar 3: Fotomicrografias representativas da expressão de GFAP na área dorsolateral do estriado.

Pág. 205

Material Suplementar 4: Análise do efeito do LPS sobre a ativação de astrócitos.

Pág. 206

Material Suplementar 5: Análise do efeito do LPS sobre a ativação de micróglia.

Pág. 207

Material Suplementar 6: Desenvolvimento de aim em camundongos lesionados com 6-OHDA após tratamento crônico com L-DOPA.

Pág. 208

Material Suplementar 7: Efeito de CPZ+CBD na atividade locomotora de camundongos lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA.

Pág. 209

Material Suplementar 8: Análise do efeito do Celec sobre a expressão de NF- κ B no estriado lesionado de camundongos.

Pág. 210

Material Suplementar 9: Efeito dos agentes inflamogênicos α -sin_f e LPS na liberação de glutamato em astrócitos.

Pág. 211

LISTA DE ABREVIACÕES

2-Br – 2-Bromocriptina

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

α -sin – Alfa-sinucleína

α -sin_r – Alfa-sinucleína em forma fibrilar

AA-5-HT – Araquidonoil serotonina

AADC – Descarboxilase de Aminoácidos Aromáticos

AIMs – Movimentos involuntários anormais

AMPc – Adenosina 5' monofosfato cíclica

APO – Apocinina

Celec – Celecoxibe

COMT – Catecol-orto-metil-transferase

COX – Ciclooxigenase

CB – Canabinóide

CBD – Canabidiol

CPZ – Capsazepina

CREB – Elemento de ligação responsivo a AMPc

D1R – Receptor de dopamina da família D1

D2R – Receptor de dopamina da família D2

DA – Dopamina

DAPI – 4',6-diamino-2-fenilindol

DARPP-32 – fosfoproteína regulada por AMPc de 32kDa

DAT – Transportador de Dopamina

DMSO – Dimetilsulfóxido

DOPAC – Ácido 3,4-diidroxifenilacético

DP – Doença de Parkinson

DPI – Cloreto difenileneiodônio

ERK – Quinase regulada por sinal extracelular

FAAH – Amida-Hidrolase de Ácidos Graxos

FK – Forscolina

FosB – Gene de ativação imediata

GFAP – Proteína glial fibrilar ácida

Glu – Glutamato

HVA – Ácido homovalínico

i.c.v. – Intracerebroventricular

i.p. – Intra-peritoneal

Iba-1 – Molécula adaptadora de ligação ao cálcio 1

IL – Interleucina

Indo – Indometacina

LCR – Líquido cefalorraquidiano

LDH – Lactato desidrogenase

LID – Discinesia induzida por L-DOPA

LPS – Lipopolissacarídeo

LTD – Depressão de longo prazo

LTP – Potenciação de longo prazo

MAO – Mono-amina-oxidase

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

MSN – Neurônios espinhosos médios

NAc – Núcleo acumbens

NET – Transportador de Noradrenalina

NeuN – Núcleo neuronal

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NMDA – N-Metil-D-Aspartato

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido nítrico sintase

NOX – NADPH oxidase

p-AcH3 – Fosfo-histona acetilada

P2X7 – Receptor purinérgico tipo 7

PG – Prostaglandina

PI3K – Fosfatidilinositol 3-quinase

PKA – Proteína Quinase A

PKG – Proteína Quinase G

PPAR – Receptor ativador de proliferação do peroxissomo

ROS – Espécie reativa de oxigênio

s.c. – Subcutâneo

SN – Substância negra

SNpc – Substância negra *pars compacta*

SNpr – Substância negra *pars reticulata*

SNC – Sistema Nervoso Central

Str – Estriado

Sulfa – Sulfasalazina

TH – Tirosina Hidroxilase

TLR – Receptor Toll-like

TNF – Fator de necrose tumoral

TROL – Trolox

TRPV – Receptor vanilóide transitório

TX – Tromboxano

Vei – Veículo

VTA – área tegmental ventral

Sumário

AGRADECIMENTOS	Pág. 9
RESUMO	Pág. 12
ABSTRACT	Pág. 13
LISTA DE FIGURAS	Pág. 14
LISTA DE TABELAS	Pág. 18
LISTA DE ESQUEMAS	Pág. 19
MATERIAL SUPLEMENTAR	Pág. 20
LISTA DE ABREVIACÕES	Pág. 21
INTRODUÇÃO	Pág. 27
1.1) A Doença de Parkinson	Pág. 28
1.2) Terapêutica e discinesia induzida por L-DOPA	Pág. 41
1.3) Neuroinflamação:	Pág. 47
OBJETIVOS	Pág. 61
2.1) Objetivo geral	Pág. 62
2.2) Objetivos específicos	Pág. 62
MATERIAL E MÉTODOS	Pág. 65
3. MATERIAL E MÉTODOS	Pág. 66
3.1) Estudos in vivo (partes 1 e 3):	Pág. 66
3.2) Metodologia (partes 1 e 3):	Pág. 66
3.3) Desenho Experimental (partes 1 e 3):	Pág. 73
3.4) Estudos <i>In Vitro</i> – Materiais e Métodos (Parte 2 e Resultados Complementares):	Pág. 79

RESULTADOS	Pág. 84
CAPÍTULO 1 – CURVA TEMPORAL DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA E ANÁLISE DE FATORES INFLAMATÓRIOS.	Pág. 85
DISCUSSÃO – CAPÍTULO 1	Pág. 112
CAPÍTULO 2 – O EFEITO DA L-DOPA/ DA E GLUTAMATO SOBRE A ATIVIDADE GLIAL E A PRODUÇÃO DE FATORES INFLAMATÓRIOS	Pág. 120
DISCUSSÃO – CAPÍTULO 2	Pág. 128
CAPÍTULO 3 – A AÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS SOBRE A DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA	Pág. 138
PARTE 3.1 – CANABINÓIDES	Pág. 139
PARTE 3.2 – INIBIDORES DE CICLOOXIGENASE	Pág. 155
DISCUSSÃO – CAPÍTULO 3	Pág. 162
CONCLUSÃO	Pág. 176
ESTUDOS COMPLEMENTARES – O EFEITO PROTETOR DA DA EM CÉLULAS MICROGLIAIS	Pág. 179
DISCUSSÃO – ESTUDOS COMPLEMENTARES	Pág. 192
MATERIAL SUPLEMENTAR	Pág. 202
REFERÊNCIAS	Pág. 212
APÊNDICE - ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE	Pág. 251

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO:

1.1) A Doença de Parkinson

Caracterização, sintomatologia e etiologia:

A Doença de Parkinson (DP), que surge com o envelhecimento, é a segunda doença neurodegenerativa em termos de incidência na população mundial. Prevalence em países industrializados, principalmente na população masculina, atingindo aproximadamente 0,3% da população (Georgiev *et al.*, 2017). Este número aumenta para 1% em se tratando da população acima dos 60 anos de idade e para 4% na população com mais de 80 anos. A idade média de manifestação na população é ao redor dos 60 anos, mas 10% dos casos classificados como “de manifestação precoce” aparecem entre os 20 e 50 anos de idade (Elbaz *et al.*, 2016).

À medida que o tamanho da população idosa aumenta, a previsão é que a incidência da DP cresça (Dorsey *et al.*, 2007), causando um aumento projetado dramático no número de casos (Kowal *et al.*, 2013). No entanto, as taxas de prevalência da DP permaneceram relativamente estáveis nas últimas décadas (Wickremaratchi *et al.*, 2009), sugerindo que a incidência da DP possa ter diminuído, embora isso nunca tenha sido demonstrado empiricamente.

A DP é uma patologia motora hipocinética de caráter progressivo. Esta doença manifesta-se na maioria dos pacientes como anormalidades de movimento proeminentes, incluindo tremor em repouso, rigidez muscular, lentidão de movimento (bradicinesia), falha no início do movimento (acinesia) e distúrbios da marcha e da postura, entre outros (Dexter e Jenner, 2013; Jankovic, 2008). Muitos desses sinais são inicialmente unilaterais, mas depois progridem para o lado oposto. Os sinais e sintomas não motores, como a insuficiência autonômica, normalmente se desenvolvem posteriormente, juntamente com complicações psiquiátricas, cognitivas e do sono (De Pablo-Fernandez *et al.*, 2017; Collins e Williams-Gray, 2016; Goodarzi e Ismail, 2017; Siegel, 2007).

A origem da DP é idiopática. A idade representa o principal fator predisponente para a DP na maioria dos indivíduos que desenvolvem a doença. No entanto, não se sabe se a idade é um dos fatores responsáveis, uma vez que uma população jovem também pode apresentar a doença, embora em menor frequência (Kempster *et al.*, 2010). Ainda assim, outros fatores podem contribuir para a origem da doença na população de terceira idade. A perda de produção de estrogênio em mulheres em período de menopausa, por exemplo, pode estar

envolvida com o início da patologia neste grupo. Há evidências de que a menopausa precoce, histerectomia ou remoção dos ovários aumenta o risco da doença quando comparada aos homens (Popat *et al.*, 2005; Ragonese *et al.*, 2004). As causas genéticas também estão se tornando mais comuns à medida que a busca de genes envolvidos com a doença continua, e pode representar até 40% das pessoas em risco na população de genes autossômicos dominantes, recessivos e de suscetibilidade (Hardy, 2010).

Fatores ambientais também podem contribuir para o risco de desenvolver a DP (Tanner, 2010). A descoberta da toxicidade da 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP) em células dopaminérgicas nigrais gerou interesse em causas ambientais para a possível manifestação da doença (Ikeda *et al.*, 1992). Outra droga com ação similar a do MPTP é a 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto (paraquat), um pesticida comercial de ervas daninhas que também leva a um quadro de parkinsonismo em roedores. A toxicidade destes compostos está relacionada ao risco aumentado de desenvolver DP, que emerge repetidamente de estudos epidemiológicos (McCormack *et al.*, 2002; Tanner *et al.*, 2009; 2011).

A mesma hipótese pode ser aplicada ao inibidor do complexo I rotenona, um constituinte do pesticida *deris* comumente usado por jardineiros como inseticida, embora nenhum caso tenha sido diretamente associado a seu uso (Betarbet *et al.*, 2000). Por outro lado, a exposição crônica à anonacina – composto derivado da *Annona muricata* (graviola) – mostrou produzir sintomas e características fisiopatológicas similares à da DP (Champy *et al.*, 2005; Lannuzel *et al.*, 2006). Outras causas ambientais incluem: exposição a solventes (n-hexano, metanol), intoxicação por monóxido de carbono, intoxicação por sulfeto de hidrogênio e, possivelmente, manganês. Neste caso, embora a síndrome resultante envolva degeneração de células estriatais e características motoras de distonia, não parece haver risco aumentado em soldadores, um grupo regularmente exposto ao vapor deste elemento químico (Kenborg *et al.*, 2012).

Uma última possível causa a ser considerada é o traumatismo craniano, que surgiu em vários casos como fator significativo para aumentar o risco de DP em estudos populacionais. Um estudo em ex-jogadores da Liga Nacional de Futebol nos Estados Unidos sugere que o traumatismo craniano aumenta o risco de desenvolver DP (Lehman *et al.*, 2012) e, portanto, pode ser um fator mais relevante do que se pensava anteriormente, embora controverso (Savica *et al.*, 2012).

A DP não tem cura e possui um alto custo socioeconômico. No Brasil ainda não existe uma avaliação precisa; no Reino Unido acredita-se que seja em torno de 3,3 bilhões/ano de Libras; nos Estados Unidos de USD 23 bilhões/ano. Na França, a estimativa é de 354 milhões/ano de Euros (Findley, 2007). Os tratamentos medicamentosos disponíveis na atualidade fornecem alívio sintomático temporário. No entanto, há sérias complicações colaterais que surgem com a cronicidade do tratamento com a maioria dos fármacos disponíveis no mercado.

A Fisiopatologia da DP:

O sistema dopaminérgico: A dopamina (DA) é um neurotransmissor de ampla atuação no sistema nervoso central (SNC) e faz parte de um grupo de neurotransmissores conhecidos como catecolaminas. Além da DA, fazem parte deste grupo a L-DOPA (precursora da DA), a noradrenalina e a adrenalina. A tirosina é o principal aminoácido precursor da via de catecolaminas, e é convertida a L-DOPA por ação da enzima Tirosina Hidroxilase (TH), enzima passo limitante da reação e utilizada como marcadora de neurônios dopaminérgicos. Outro aminoácido que pode ser utilizado como precursor de catecolaminas é a fenilalanina, e ambos os precursores podem ser encontrados em grandes concentrações no encéfalo e no plasma. Em mamíferos, a fenilalanina oriunda da dieta pode ser convertida a tirosina pela ação da fenilalanina hidroxilase, encontrada no fígado (Siegel *et al.*, 2007).

Uma vez produzida pela TH, a L-DOPA é convertida rapidamente a DA. A enzima que realiza essa conversão é a descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC). Essa enzima possui capacidade de originar outros neurotransmissores a partir de precursores, como a serotonina: por ter baixa especificidade pelo substrato, é capaz de descarboxilar também o triptofano, precursor da serotonina. Por esta razão, esta enzima não é utilizada como um marcador clássico de células dopaminérgicas (Zigmond *et al.*, 1999).

A DA é hidrofílica, o que impossibilita sua passagem pela barreira hematoencefálica. Ela é então armazenada em vesículas, podendo dar origem a outras catecolaminas em seus neurônios específicos (noradrenérgicos e adrenérgicos). Seu armazenamento em vesículas acontece pelo transportador vesicular VMAT2, sendo que as vesículas se localizam no terminal do axônio, próximo à sinapse, onde estas podem rapidamente se fundir à membrana e promover exocitose. A presença de catecolaminas nas vesículas é importante na proteção contra a inativação enzimática promovida pelas enzimas mono-amina-oxidase (MAO) e catecol-orto-metil-transferase (COMT).

A MAO é uma enzima que se localiza na membrana externa das mitocôndrias dos neurônios pré-sinápticos e, como já dito, tem por função a inativação e degradação desses neurotransmissores, impedindo sua ação prolongada. Sua forma de inativação é através da desaminação das catecolaminas por um processo oxidativo. A COMT se encontra em quase todas as células, e no caso do SNC, principalmente na membrana de neurônios pós-sinápticos. Os principais produtos de degradação da DA encontrados no fluido espinhal e utilizados como referência do metabolismo dopaminérgico são o ácido homovanílico (HVA) e o Ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) (Siegel *et al.*, 2007).

As catecolaminas podem ser consideradas neurotransmissores clássicos, já que, além de diversos outros parâmetros, sua liberação ocorre por exocitose de vesículas. Ou seja, elas se unem à membrana plasmática e liberam o neurotransmissor na fenda sináptica, sendo esse processo dependente de Ca^{2+} . Entretanto, existem relatos de que a DA ou a noradrenalina podem ser liberadas por um processo independente de Ca^{2+} , mas dependente de Na^+ e/ou Cl^- , por uma reversão do transportador pré-sináptico da DA (DAT) ou da noradrenalina (NET) (Amara e Arriza, 1993). A principal função desses transportadores, no entanto, é a de recaptar essas catecolaminas para o interior do neurônio após elas terem sido liberadas na fenda sináptica. Esta ação permite que elas sejam degradadas no citosol e, por conseguinte, impede sua ação a longo prazo sobre seus receptores, presentes na membrana de neurônios pós e pré-sinápticos.

Em particular, a perda funcional de neurônios dopaminérgicos está implicada em uma série de alterações cognitivas, motoras e comportamentais, envolvidas em um conjunto de patologias neurológicas. Por exemplo, um quadro de déficit de DA na via nigroestriatal leva a alterações motoras do tipo hipocinéticas. Entretanto, a ausência de neurônios produtores de DA permite que neurônios que sintetizam a enzima AADC (como os neurônios serotoninérgicos) convertam a L-DOPA (exógena, advinda do tratamento para doenças hipocinéticas) em DA sem um mecanismo regulatório eficaz. Como consequência, isso resultaria em um quadro de superestimulação dos receptores dopaminérgicos e, consequentemente, a alterações do movimento tipicamente hiperkinéticas (Carta e Tronci, 2014; Cenci, 2014).

A DA tem sua ação sobre receptores que se classificam em cinco subtipos, sendo que esses podem ser divididos em duas classes distintas: a família D1, incluindo os receptores D1 e D5; e a família D2, que inclui D2, D3 e D4 (Tarazi e Baldessarini, 1999). Os receptores

dopaminérgicos são do tipo metabotrópico, ou seja, receptores acoplados a proteínas G. Essas proteínas ativam ou inativam vias intracelulares capazes de gerar segundos mensageiros. Estes receptores são encontrados pré e pós-sinapticamente (figura 1).

Figura 1: Via de síntese, armazenamento, liberação, estímulo, recaptação e degradação de catecolaminas. Drogas capazes de alterar a funcionalidade fisiológica deste sistema estão citadas, com seu mecanismo de ação também descritos. DAT: transportador de dopamina; D1R: receptor de dopamina tipo 1; D2R: receptor de dopamina tipo 2; VMAT transportador vesicular de monoaminas; MAO: monoaminoxidase; COMT: catecol-O-metiltransferase. Extraído de Bear *et al.*, 2002; modificado por dos-Santos-Pereira, 2017.

A família D1 está acoplada positivamente à adenilil ciclase. Esta ativação ocorre através da ligação do receptor a uma proteína G do tipo estimulatória (Gs/Golf), que ao ser estimulada leva a um aumento nos níveis de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) intracelulares. A família D2 está acoplada negativamente à adenilil ciclase. Esta inibição ocorre através da ligação de uma proteína G do tipo inibitória (Gi/G0) e, portanto, leva a uma diminuição dos níveis de AMPC intracelulares.

É importante citar que a exposição crônica dos receptores a neurotransmissores/agonistas diretos ou indiretos (como bloqueadores do transportador de DA) resultam na diminuição da responsividade, processo conhecido como dessensibilização. Na dessensibilização, os receptores de DA podem se desacoplar de seu mecanismo efetor imediato (neste caso específico, o desacoplamento da proteína G), ou passar pelo fenômeno de *downregulation*, que geralmente requer um período maior de tempo e envolve a

internalização do receptor e em alguns casos, sua degradação. Por outro lado, a exposição crônica a antagonistas ou a retirada brusca de neurotransmissores/agonistas leva a um quadro conhecido como hipersensibilização, caracterizado por aumentos compensatórios na densidade (*upregulation*) e/ou responsividade do receptor (Siegel *et al.*, 2007).

Distribuição dopaminérgica no SNC – a via nigroestriatal e os núcleos da base:

As vias dopaminérgicas: Alguns dos grupos neuronais mais estudados que dependem da neurotransmissão dopaminérgica incluem os neurônios mesencefálicos com projeções nigroestriatais, envolvidos no movimento corporal (e, conseqüentemente, na DP) e os neurônios mesolímbicos e mesocorticais, envolvidos na ação de antipsicóticos (haloperidol), drogas anti-hiperatividade (metilfenidato) e drogas de abuso (cocaína, anfetamina). Dentre as vias dopaminérgicas, também podemos citar projeções da retina e do bulbo olfatório para o mesencéfalo ventral e área lemniscal (Siegel *et al.*, 2007) (figura 2). O sistema de projeção nigroestriatal exerce sobre o estriado uma profunda influência que afeta os aspectos motor e motivacional do comportamento (Gerfen e Wilson, 1996). Esta projeção faz parte de um sistema mesotelencefálico maior que se origina em neurônios dopaminérgicos espalhados no campo retrorubral, substância negra *pars compacta* (SNpc) e área tegmental ventral (VTA) (Dahlström e Fuxe, 1964).

Figura 2: Estruturas encefálicas de ação dopaminérgica e suas principais vias no Sistema Nervoso Central. Extraído de Crocker, 1994; adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017.

Os Núcleos da Base: A DP é caracterizada, dentre vários fatores, pela depleção de DA estriatal causada pela morte de neurônios dopaminérgicos da substância negra (SN) e da via nigroestriatal. Esta perda celular gera um desbalanço intenso na neurotransmissão dos núcleos da base, composto pelo neoestriado ou caudado/putâmen, globo pálido (também chamado globo pálido externo ou lateral), núcleo entopeduncular (também chamado globo pálido interno ou medial), SN (*pars compacta* e *pars reticulata*) e núcleo subtalâmico (Parent e Hazrati, 1995) (figura 3). Os núcleos da base estão envolvidos no controle adaptativo do comportamento motor, cognitivo e motivacional. Disfunções nos núcleos da base ocorrem em várias doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas como a DP, doença de Huntington, dependência de drogas de abuso, transtorno de déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia e síndrome de Tourette (Chao e Nestler, 2004; Comings, 2001; Delong, 1990; Delong e Wichmann, 2007; Graybiel, 2005; Keshavan *et al.*, 2008; Saka e Graybiel, 2003).

Figura 3: Estruturas dos núcleos da base. Corte coronal do encéfalo apontando as estruturas dos núcleos da base (Núcleo caudado, putamen, substância negra, globo pálido, núcleo subtalâmico, tálamo) e estruturas associadas (córtex e hipotálamo). Extraído de Purves *et al.*, 2012.

O estriado corresponde ao principal núcleo de entrada dos núcleos da base e recebe aferências excitatórias glutamatérgicas provenientes do córtex cerebral e tálamo (Bolam *et al.*, 2000). O estriado é subdividido em uma parte dorsal principalmente envolvida no controle motor (Graybiel *et al.*, 1994; Hikosaka *et al.*, 2000; Packard e Knowlton, 2002, Yin e Knowlton, 2006) e uma parte ventral ou núcleo acumbens (NAc) que está implicado nos processos de motivação e recompensa (Belin *et al.*, 2009).

Adicionalmente às aferências corticais, o estriado recebe aferências dopaminérgicas da SNpc (Calabresi *et al.*, 1998) e serotoninérgicas dos núcleos da rafe (Hauber, 1998). Por sua vez, as projeções eferentes estriatais se restringem a algumas estruturas próprias dos núcleos da base, como o globo pálido, o núcleo entopeduncular e a SN, principalmente a reticulada (SNpr). Os neurônios que se projetam para o globo pálido externo (componentes da via estriatopálidal) contêm GABA e encefalina, enquanto os neurônios com projeções eferentes para o globo pálido interno ou SNpr (via estriatonigral) contêm encefalina, substância P e/ou dinorfina (Parent e Hazrati, 1995).

Vias direta e indireta: A DA atua no estriado através dos neurônios espinhosos médios (MSNs), que compõem 95% dos neurônios no estriado e quase 100% dos neurônios de projeção. A visão canônica da interação entre a neurotransmissão glutamatérgica e dopaminérgica nestas células estriatais, que fazem parte do modelo de via direta/indireta, originou-se em trabalhos que hipotetizaram uma organização dupla do estriado (Albin *et al.*,

1989; DeLong, 1990). De acordo com este modelo, a ativação cortical produz liberação de glutamato que ativa os MSNs projetados para múltiplas áreas dos núcleos da base. Esta divisão resultaria na diferença neuroanatomofuncional das vias direta e indireta.

Os MSNs que são projetados para a SNpr e globo pálido interno (após a ativação glutamatérgica) ativam um grupo de neurônios que compõem a via direta. Os MSNs são células GABAérgicas; assim, eles exercem uma ação inibitória sobre os neurônios da SNpr que, por sua vez, também são GABAérgicos. Essa inibição do globo pálido interno e da SNpr leva a uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos talâmicos, que projetam neurônios excitatórios para o córtex. O resultado comportamental dessa cadeia de eventos é a ativação locomotora e geração dos movimentos (figura 4).

Figura 4: Caracterização fisiológica da via direta. As setas indicam as projeções de neurônios com seus respectivos neurotransmissores. As representações (+) indicam estimulação e as (-) indicam inibição. Extraído de Purves *et al.*, 2012.

Por outro lado, a ativação de MSNs estriatopálidais, que se projetam indiretamente ao SNpr através do globo pálido externo e do núcleo subtalâmico (via indireta), inibe os neurônios GABAérgicos do globo pálido externo, levando a uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do núcleo subtalâmico. O aumento da transmissão excitatória desses

neurônios subtalâmicos, por sua vez, ativa os neurônios da SNpr GABAérgicos projetados para o tálamo que, uma vez inibidos, não ativam o córtex motor primário. Consequentemente, esse efeito resulta na redução da atividade locomotora e do movimento (figura 5).

VIA INDIRETA DOS NÚCLEOS DA BASE

Figura 5: Caracterização fisiológica da via indireta. As setas indicam as projeções de neurônios com seus respectivos neurotransmissores. As representações (+) indicam estimulação e as (-) indicam inibição. Extraído de Purves *et al.*, 2012.

Além das suas projeções distintas, os MSNs da via direta e indireta são caracterizados pela expressão diferencial de receptores de DA. Os D1R são expressos por MSNs de via direta (via estriatonigral), enquanto os receptores D2 são expressos por MSNs de via indireta (ou via estriatopallidal). Como dito anteriormente, estes dois receptores estão associados a proteínas G distintas que estão ligadas a diferentes vias de sinalização intracelular e conduzem a diferentes respostas bioquímicas após a ativação do receptor de DA. Essa segregação neuroquímica é considerada um suporte adicional para um efeito dicotômico da ativação das vias direta e indireta (Gerfen *et al.*, 1990; Gerfen e Surmeier, 2011). A diminuição da sinalização dos receptores D1R e D2R causada pela ausência de DA diminui e desorganiza os movimentos, levando a um quadro hipocinético característico da DP (Jenner, 2008a).

Uma terceira via também foi descrita recentemente, conhecida como via hiperdireta, que inclui estruturas como o córtex, o globo pálido interno, o núcleo subtalâmico e a SNpr (Nambu *et al.*, 2000). Esta via conduz estímulos excitatórios a partir das áreas motoras corticais para os núcleos de saída, em especial o núcleo subtalâmico, sem depender/envolver a participação do estriado (Kitai e Deniau, 1981; Nambu *et al.*, 2002), e seus efeitos têm um tempo de condução mais curto que aqueles transmitidos através das vias direta e indireta. A hipótese é de que esta via permite a prevenção de uma resposta prematura, sendo particularmente importante em situações de extenso conflito entre ativação das diferentes vias ao inibir a atividade motora indesejada (Nambu *et al.*, 2002).

Apesar de sua eficiência, este modelo de trabalho ainda apresenta limitações e restrições. Embora alguns achados recentes levantem dúvidas quanto a uma aplicação muito rígida do modelo de via direta/indireta, a literatura não fornece evidências convincentes contra isso. Ainda assim, alguns grupos renomados acreditam que estes modelos, que tentam explicar toda a atividade complexa da função dos núcleos da base em condições fisiológicas e patológicas, precisam ser revisados para integrar descobertas científicas mais recentes (Calabresi *et al.*, 2014).

Características fisiopatológicas da DP:

A degeneração celular de DA é considerada a principal característica na fisiopatologia da DP (Agid e Blin, 1987; Hornykiewicz, 1998). Os déficits motores presentes na DP estão classicamente atribuídos à degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNpc, o que resulta em uma significativa depleção de DA no estriado, a região de projeção primária do SNC.

De acordo com o modelo clássico da organização anatomofuncional dos núcleos da base, a atividade patológica registrada nos núcleos da base na DP é consequência da depleção da DA no estriado (Albin *et al.*, 1989). A depleção de DA estriatal em pacientes com DP e em modelos animais que mimetizam a lesão da via nigroestriatal resulta em alterações da taxa e/ou padrão de disparo dos neurônios do globo pálido externo, interno e núcleo subtalâmico. O padrão regular tônico de disparo neuronal em condições normais também muda para um padrão de disparos patológicos exagerados com oscilações após lesões de células dopaminérgicas na SNpc (Albin *et al.*, 1989; Benazzouz *et al.*, 2002; Bergman *et al.*, 1994; Boraud *et al.*, 1998; Breit *et al.*, 2007; DeLong, 1990; Hutchison *et al.*, 1998; Magill *et al.*, 2001; Ni *et al.*, 2000; 2001; Rivlin-Etzion *et al.*, 2010; Wichmann *et al.* 1994).

Todavia, tem sido mostrado que a DP afeta outras regiões encefálicas não-dopaminérgicas ou não-componentes dos núcleos da base, como o *locus coeruleus*, a formação reticular do tronco encefálico, os núcleos da rafe, a amígdala e o hipocampo, entre outros (Jellinger, 2012). A participação desses núcleos na DP sugere o envolvimento crítico de outros neurotransmissores no desenvolvimento da doença, como o glutamato.

Foi demonstrado que a excitotoxicidade causada pelo excesso de liberação e/ou falha de *clearance* de glutamato é uma das responsáveis pela morte neuronal ocorrente na DP. O núcleo subtalâmico, que libera glutamato e inerva parte do globo pálido, apresenta atividade exacerbada em pacientes e modelos de DP e pode gerar a excitotoxicidade glutamatérgica causadora de morte celular (Bevan *et al.*, 2002; Steigerwald *et al.*, 2008). Além disso, excitotoxinas que causam morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc (como a 6-hidroxidopamina) tem sua ação bloqueada na presença de antagonistas glutamatérgicos, indicando que a apoptose ocorrida nesses casos tem participação da transmissão glutamatérgica (Vernon *et al.*, 2007a; 2007b; Turski *et al.*, 1991; Hovelso *et al.*, 2012).

Outras hipóteses são amplamente aceitas como colaboradoras no processo de degeneração da DP. O estresse oxidativo possui uma função fundamental na evolução da doença, assim como danos mitocondriais, deficiência de fator de crescimento, ou uma disfunção no sistema de degradação de proteína (sistema ubiquitina-proteassoma) (para revisão: Hirsch e Hunot, 2009).

Um fator também importante na citotoxicidade da DP é a formação de agregados proteicos. Os corpos de Lewy, como são chamados esses agregados, são inclusões anormais que se acumulam dentro dos neurônios na DP. Estes agregados foram descritos em várias outras doenças neurodegenerativas, incluindo a demência de corpo de Lewy e a atrofia do Múltiplo-Sistema, mas a importância desses agregados de proteínas para a origem destas várias patologias ainda não está completamente caracterizada.

A análise pós-morte dos encéfalos de pacientes com a DP revelou que a maioria dos corpos de Lewy ocorrem dentro dos neurônios dopaminérgicos remanescentes na SNpc, além de algumas outras populações neuronais centrais e periféricas (Dickson, 2012; Hughes *et al.*, 1993; Jellinger, 1987; Takahashi e Wakabayashi, 2001). O principal componente desses corpos de Lewy são fibras de α -sinucleína (α -sin) insolúveis (Spillantini *et al.*, 1997), mas também incluem as proteínas ubiquitina e Tau. Os corpos de Lewy clássicos são normalmente descritos como “inclusões intraneuronais, redondas e eosinofílicas com um núcleo hialino e

um halo periférico pálido que são sempre positivos para α -sin e ubiquitina” (Takahashi e Wakabayashi, 2001).

Os neuritos de Lewy também são abundantes na DP e referem-se a neuritos anormais contendo material granular e filamentos de α -sin, semelhantes aos encontrados em corpos de Lewy. Os neuritos de Lewy são mais abundantes que os corpos, e se acumulam na amígdala e no estriado na maioria dos casos da DP (Braak *et al.*, 2003, Duda *et al.*, 2002). Curiosamente, os neuritos são detectados antes da aparência de corpos de Lewy e, portanto, o impacto dos corpos de Lewy na fisiologia celular pode ter maior relevância para os estágios posteriores da DP (figura 6).

Figura 6: Fotomicrografias da SNpc em paciente com DP mostrando corpos e neuritos de Lewy. Os painéis superiores mostram uma ampliação de 60x das inclusões intraneuronais de α -sin agregadas para formar corpos de Lewy. Os painéis inferiores são ampliações (20x) de imagens que mostram neuritos de Lewy bem ramificados e corpos de Lewy arredondados de vários tamanhos. As células carregadas com neuromelanina da substância negra são visíveis ao fundo. Extraído de Rajan, 2012.

A presença de corpos de Lewy também já foi descrita em células gliais, ainda que dados controversos também tenham sido demonstrados (Piao *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2014). Bruck *et al.* (2015) e Miller *et al.* (2004) discutem que a presença de α -sin em células gliais depende diretamente do tipo de patologia a qual esta proteína está associada. Na DP, ainda não existe um consenso sobre a presença de corpos de Lewy na glia; entretanto, a maioria dos trabalhos concorda que a presença de α -sin ocorre principalmente nos neurônios.

A excitotoxicidade glutamatérgica e a presença de agregados de α -sin também estão relacionados a um processo neuroinflamatório, que tem papel fundamental na origem da DP. A neuroinflamação na DP e após o tratamento com L-DOPA será discutida posteriormente.

1.2) Terapêutica e discinesia induzida por L-DOPA

O tratamento para a DP – a L-DOPA:

Com o passar dos anos, não houveram grandes avanços no campo farmacológico para o tratamento da DP. Apesar de muitos medicamentos terem sido estudados e desenvolvidos ao longo dos últimos anos, incluindo agonistas de DA (como o ropinirol e o pramipexol) e inibidores da MAO-B e COMT - enzimas que degradam DA - dentre outras associações, a L-DOPA (precursora da síntese de DA) ainda é considerada a droga mais eficaz para aliviar a maior variedade de sintomas motores da doença, através da reposição de DA degradada no encéfalo de pacientes.

A L-DOPA ajuda a reduzir o tremor, rigidez e lentidão típicos da DP, além de ajudar a melhorar o controle muscular, o equilíbrio e a caminhada. Quando os agonistas de DA são utilizados sozinhos, eles são úteis para aliviar a maioria dos sintomas da DP precoce, especialmente aqueles que afetam a função motora (como rigidez e lentidão). Entretanto, eles não são tão eficazes quanto a L-DOPA no controle do tremor e outros sintomas, e alguns relatos sugerem que eles tendem a ter mais efeitos colaterais do que a L-DOPA, como náusea, hipotensão e alucinações (Katzenschlager *et al.*, 2008).

Os tratamentos farmacológicos disponíveis até o momento somente colaboram no controle de sintomas motores, sem apresentar efeitos benéficos nos sintomas não-motores, além de não retardarem a progressão da neurodegeneração da doença (Dexter e Jenner, 2013). Fora da área dopaminérgica, apenas os anticolinérgicos e o fraco antagonista do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) amantadina tiveram algum uso. Mas estas são todas abordagens para o tratamento dos déficits motores da DP com pouco efeito sobre os sintomas não-motores. É importante ressaltar que, até o momento, o consenso é de que nenhuma droga utilizada para o tratamento motor da DP tem habilidade de evitar a progressão da doença.

Várias tentativas foram realizadas para determinar se as terapias farmacológicas disponíveis têm algum efeito sobre a progressão da DP. A L-DOPA tem um histórico contraditório com relação à aceleração ou desaceleração da morte celular dopaminérgica típica da doença. Um ensaio clínico realizado com L-DOPA apontou que seu uso precoce parece retardar a progressão da DP com base em escalas de avaliação clínica, mas não através de técnicas de imageamento (Fahn, 2005). De forma contraditória, durante muitos anos, a

capacidade da L-DOPA de gerar radicais livres e induzir a morte de células dopaminérgicas em cultura deu à droga um rótulo de neurotóxica. Entretanto, com base em uma variedade de estudos *in vivo* em animais, estudos pós-morte em humanos e experimentos clínicos, estes dados não foram reproduzidos, embora o debate continue (Agid, 1998; Olanow *et al.*, 2008; Parkkinen *et al.*, 2011). Atualmente, a literatura concorda que o tratamento com L-DOPA em pacientes com DP não influencia a evolução da doença, seja de forma positiva ou negativa.

Ainda assim, é falha a discussão sobre a capacidade de o tratamento crônico com L-DOPA levar a um quadro neuroinflamatório, potencialmente prejudicial ao funcionamento neuronal e, em grande escala, capaz de comprometer o funcionamento de estruturas encefálicas.

Efeitos colaterais – a discinesia induzida por L-DOPA:

Como a L-DOPA controla os sintomas da DP de maneira eficaz - e com tão poucos efeitos colaterais no início - há algum benefício para as pessoas que iniciam o tratamento com L-DOPA, em vez de agonistas de DA. Um paciente com DP que inicia o tratamento com L-DOPA pode ter mais anos de idade com melhor controle de sintomas e menos efeitos colaterais iniciais (Katzenschlager *et al.*, 2008). Contudo, a eficácia a longo prazo torna-se limitada pelo desenvolvimento de complicações motoras extremamente incapacitantes, que tendem a levar ao atraso do início do tratamento com este fármaco, como por exemplo, o *wearing off*, as flutuações *on-off* e a discinesia. O *wearing off*, ou deterioração de fim de dose, se caracteriza pela diminuição da duração do efeito motor da L-DOPA, necessitando de intervalos menores de administração do fármaco. O fenômeno *on-off* se dá por uma mudança brusca e repentina do estado de mobilidade do paciente; ou seja, um paciente em bom estado motor sob efeito da L-DOPA muda abruptamente para o estado parkinsoniano, ou vice-versa (Nutt *et al.*, 1984).

A discinesia induzida por L-DOPA (LID – *L-DOPA-induced dyskinesia*), por sua vez, é descrita como um conjunto de movimentos involuntários anormais incapacitantes (Jenner, 2008b). A LID pode ser uma mistura de coreia, balismo e distonia e, em menor grau, mioclonia, uma contração muscular súbita e involuntária que se verifica especialmente nas mãos e nos pés (Nutt, 1990). As formas mais severas da LID também podem afetar os olhos e os músculos respiratórios.

A LID é mais comum no nível máximo de ação da L-DOPA ("discinesia de pico de dose"), que ocorre nas primeiras horas após o tratamento, e menos frequente ao longo do período ("discinesia em onda quadrada"). Os movimentos coreicos nos membros são a forma mais comum de discinesia de pico de dose, mas a postura distônica dos membros também ocorre. Esses movimentos involuntários são comuns na região crânio-cervical e podem ser inicialmente suaves, envolvendo principalmente o pescoço, e menos comumente afetar os lábios e o maxilar. Mas após certo tempo, esses movimentos passam a envolver o tronco e podem se tornar movimentos mais incômodos (Calabresi *et al.*, 2010; Fabbrini *et al.*, 2009). Em geral, reduzir a dose de L-DOPA reduz o nível da discinesia de alta dose, embora esta prática se torne desinteressante quando este efeito acompanha uma redução da eficácia antiparkinsoniana da droga (Aquino e Fox, 2015). Baseado nisso, métodos alternativos que busquem a redução da LID sem afetar o bom desempenho motor dos indivíduos sob efeito da L-DOPA se tornam necessários.

Frequentemente, a gravidade da discinesia de pico pode oscilar devido a estressores externos não necessariamente correlacionados aos níveis plasmáticos de L-DOPA, como a ansiedade (Feuerstein *et al.*, 1977). Isto se relaciona a mecanismos complexos que afetam os níveis de DA em diferentes estruturas encefálicas, sem necessariamente depender dos níveis plasmáticos de L-DOPA (por exemplo, variabilidade no transporte através da barreira hematoencefálica; Bezard *et al.*, 2001; Sage *et al.*, 1991). Corroborando este dado, muitos pacientes não experimentam a LID após as primeiras doses na parte da manhã, mas apenas à tarde e à noite, apesar de tomarem doses equivalentes ao longo do dia. Isto sugere não somente que alterações encefálicas ao longo do dia podem estar relacionadas com a manifestação da LID, assim como pode haver também um acúmulo de L-DOPA no SNC ao longo do tempo (Aquino e Fox, 2015).

Em modelos animais é possível reproduzir a LID. O tratamento crônico com L-DOPA em roedores que tenham a via nigroestriatal comprometida leva à indução de movimentos involuntários anormais (AIMs - *abnormal involuntary movements*) estereotipados que, apesar de suas restrições, conseguem mimetizar o quadro hiperkinético ocorrente em humanos (Lundblad *et al.*, 2005; Pavón *et al.*, 2006). Estes modelos são utilizados em ensaios pré-clínicos para avaliar não somente alterações estruturais e moleculares envolvidas com a doença, mas também possíveis intervenções farmacológicas para a diminuição da LID. A análise da manifestação da LID em modelos experimentais será explicada posteriormente (Materiais e Métodos, seção 3.2 – Análise Comportamental).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento da LID são a progressão da doença (isto é, a evolução da degeneração dopaminérgica) e a terapia crônica com L-DOPA (Aquino e Fox, 2015). Pacientes com neurodegeneração dopaminérgica avançada tendem a apresentar LID mais rapidamente; inclusive, pessoas com DP precoce, que possuem uma neurodegeneração mais avançada em um menor período de tempo, manifestam a LID mais rapidamente após iniciarem o tratamento com L-DOPA (Rascol *et al.*, 2000). A duração do uso de L-DOPA também é causa de desenvolvimento de complicações devido à estimulação fásica de modo crônico de receptores pós-sinápticos dopaminérgicos, o que significa que o número de indivíduos que venham a apresentar LID ao longo do tratamento aumenta consideravelmente (Jenner, 2008b). Em geral, 10% dos pacientes desenvolvem flutuações motoras após o início da terapia com L-DOPA, chegando a alcançar 80% dos usuários, dependendo da progressão da doença e do tempo de uso do fármaco (Ahlskog e Muenter, 2001; Marsden e Parkes, 1977; Parkinson's Study Group, 1996). De modo consistente, observações feitas em modelos animais da DP demonstram que o tratamento com agonistas dopaminérgicos de forma prolongada ou contínua resulta em menos ou nenhuma discinesia em comparação com a dosagem repetida de L-DOPA intermitente (Blanchet *et al.*, 1995; Engber *et al.*, 1989).

Fisiopatologia da LID:

A LID representa uma desordem do sistema motor que resulta na incapacidade de suprimir movimentos excessivos e sem propósito. Conforme descrito por Cenci e Konradi (2010), a superativação das vias de sinalização dependentes de D1R pode causar grandes rearranjos morfológicos e funcionais nos neurônios do estriado ("muita plasticidade"), mas também sequestrar a maquinaria molecular pela qual esses neurônios respondem normalmente a estímulos recebidos. Os neurônios estriatais integram entradas corticais e talâmicas para modificar a saída dos núcleos da base, desempenhando um papel fundamental na seleção de movimentos e no controle motor adaptativo (Wiecki e Frank., 2010). A sinalização dependente de D1 desregulada e a potencialização sustentada das sinapses corticoestriatais causam um bloqueio anormal de comandos corticais de ordem motora, sendo a chave para essa desordem de movimento.

Esta hipótese fisiopatológica é apoiada por um grande número de observações clínicas. Nos estágios iniciais da DP, o tratamento com L-DOPA promove a plasticidade "positiva", resultando em benefício sintomático duradouro (Cenci *et al.*, 2009), eficácia melhorada de

métodos de estimulação cortical não-invasiva (Fierro *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2008) e modulação da plasticidade sináptica dependente da atividade nos neurônios de saída dos núcleos da base (Prescott *et al.*, 2009). Em contraste, nos estágios avançados da DP, o tratamento com L-DOPA perde sua capacidade de induzir uma melhora sintomática duradoura, que se estende além dos efeitos de doses únicas (Nutt e Holford, 1996). Nestes estágios da doença, a L-DOPA piora as funções de aprendizagem dependentes do estriado (Cools *et al.*, 2007; Feigin *et al.*, 2003) e afeta negativamente a plasticidade cortical (Calabresi *et al.*, 2015).

O surgimento da LID e a superativação corticoestriatal estão associados a alterações moleculares nos núcleos da base com alterações dopaminérgicas comprometidas. A hipótese é que os receptores de DA pós-sinápticos se tornem supersensibilizados devido à ausência da neurotransmissão dopaminérgica no estriado (Calabresi *et al.*, 2008). Embora tanto a via direta quanto a indireta sejam afetadas ao longo da progressão da DP, a via direta envolvendo os D1R está preferencialmente envolvida no desenvolvimento da LID. Aubert *et al.* (2005) demonstraram que macacos lesionados com MPTP que desenvolvem LID após o tratamento com L-DOPA possuem o RNAm de D1R aumentado, enquanto o mesmo efeito não é observado em macacos sem LID. Este grupo também provou que o nível de supersensibilidade de D1DR nesses animais correlaciona-se positivamente com a gravidade da LID. Estes dados sugerem que a administração crônica de L-DOPA aumenta a expressão de D1R e a ligação DA/D1R no estriado. Os agonistas seletivos de D1R também levam à manifestação da LID em ratos, enquanto os antagonistas D1R podem reduzir a gravidade da LID em modelos animais (Taylor *et al.*, 2005; Westin *et al.*, 2007). Darmopil *et al.* (2009) demonstraram que roedores que não possuem o D1R não desenvolvem LID.

A eficiência do acoplamento do receptor D1 à proteína G estimulatória é amplamente aumentada em animais crônicos tratados com L-DOPA (discinéticos) em comparação a animais não lesionados que receberam L-DOPA (Aubert *et al.*, 2005). A sensibilidade aumentada dos receptores D1 estriatais está implicada em mudanças moleculares plásticas que são necessárias para a indução da LID, como a ativação da cascata sinalizadora dependente da fosfoproteína regulada por AMPc de 32kDa (DARPP-32) (Cenci, 2007; Santini *et al.*, 2007). O tratamento crônico com agonistas dopaminérgicos nessa região pode levar a alterações em vias sinalizadoras como a da PKA (proteína quinase A dependente de AMPc) e consequentemente ao CREB (proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMPc), que se

liga à região promotora de diversos genes e pode induzir a transcrição de genes de resposta imediata.

Vários estudos independentes documentaram uma estreita associação entre a LID e alterações na atividade de genes de resposta imediata e proteínas nos neurônios estriatais. Os AIMs induzidos por L-DOPA estão diretamente correlacionados aos níveis de expressão estriatal de fatores de transcrição relacionados à prodinorfina (pré-proencefalina-B) (Cenci *et al.*, 1998) e FosB/ Δ FosB (Andersson *et al.*, 1999), e esses achados foram posteriormente reproduzidos por diversos grupos, incluindo o nosso (Cenci, 2007; Padovan-Neto *et al.*, 2009; 2011; 2013). Os níveis estriatais do RNAm de Δ FosB e prodinorfina permanecem regulados de maneira positiva durante semanas após a interrupção do tratamento com L-DOPA (Andersson *et al.*, 2003), proporcionando assim fatores moleculares que podem ser associados à LID, como estes marcadores de transcrição a longo prazo. Corroborando estes dados, camundongos *knockout* para D1R lesionados com 6-hidroxidopamina (6-OHDA) e tratados cronicamente com L-DOPA não têm expressão aumentada de FosB ou dinorfina no estriado quando comparados a camundongos de tipo selvagem ou *knockout* para D2R (Darmopil *et al.*, 2009).

Nos extratos de proteínas do “estriado discinético” – estriado lesionado tratado com L-DOPA - os fatores de transcrição de FosB/ Δ FosB se ligam com alta afinidade às sequências de DNA que englobam os sítios de proteína 1 do ativador (AP-1) e os elementos de resposta ao AMPc (CRE), incluindo as sequências presentes no promotor do gene da prodinorfina (Andersson *et al.*, 2001). O caminho de sinalização através do qual a L-DOPA induz as proteínas FosB/ Δ FosB (e, secundariamente, o RNAm da prodinorfina; Andersson *et al.*, 1999) nos neurônios estriatais envolvem não somente os D1R, mas também quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK 1/2; Westin *et al.*, 2007). Estes últimos se tornam ativados através de uma cascata de eventos de fosforilação sequencial que podem ser iniciados por estimulação de receptores acoplados à proteína G ou receptores de tirosina quinase na membrana plasmática. A fosforilação/ativação de ERK 1/2 pode, por sua vez, provocar mudanças na expressão gênica através da fosforilação de fatores de transcrição nuclear e histona quinases envolvidas na remodelação da cromatina (p-AcH3; Cenci e Lundblad, 2006). A ativação estriatal de ERK 1/2 e a regulação positiva de FosB/ Δ FosB ou prodinorfina (St-Hilaire *et al.*, 2005) são totalmente prevenidas quando a L-DOPA é coadministrada com um antagonista seletivo de D1R, enquanto os antagonistas dos receptores D2 não têm efeito.

Portanto, a LID parece ser um conjunto complexo de fenômenos, em termos de apresentação clínica, molecular e farmacológica. Essa complexidade talvez explique o porquê, apesar da extensa pesquisa pré-clínica e clínica focada no aumento de opções terapêuticas, poucos agentes foram eficazes em reduzir a LID ou fazer com sucesso a translação de ensaios pré-clínicos para clínicos. Neste contexto, o uso de drogas já disponíveis na área clínica pode se tornar uma alternativa interessante para o controle da LID em pacientes com DP.

1.3) Neuroinflamação:

A neuroinflamação na DP e LID:

A neuroinflamação no SNC refere-se à resposta coletiva das células do encéfalo contra insultos diversos (invasores patógenos, traumatismos, proteínas agregadas ou modificadas, acidente vascular cerebral, etc.) projetados para remover ou inativar agentes nocivos e para inibir e/ou reverter seus efeitos prejudiciais (Olmos e Lladó, 2014). Este processo, ocorrente tanto na DP quanto na LID, é caracterizado por uma combinação da ativação de diversos tipos celulares (neurônios, micróglia e astrócitos, entre outros) de forma aguda ou crônica. A inflamação aguda inicialmente apresenta efeitos benéficos para o SNC, minimizando a lesão e contribuindo para a recuperação do tecido lesado. Entretanto, a neuroinflamação crônica produz mediadores com efeito duradouro, com *feedback* positivo, que permanecem após a lesão inicial (Glass *et al.*, 2010; Allan e Rothwell, 2003).

Alterações inflamatórias parecem estar envolvidas no processo de neurodegeneração da DP em diversos níveis (Schiess, 2003; Hirsch e Hunot, 2009). O conceito de alteração inflamatória no encéfalo de pacientes com DP começou com a descrição da presença de micróglia ativada na SNpc (McGeer *et al.*, 1988; McCormack *et al.*, 2002). Posteriormente, ficou bem estabelecido que a perda de neurônios dopaminérgicos nestes pacientes/modelos está associada a uma reação glial significativa. Especificamente, observa-se um leve grau de astrogliose, juntamente a uma resposta microglial mais robusta (Forno *et al.*, 1992).

Vários estudos experimentais têm investigado o papel das alterações inflamatórias na DP em maior detalhe utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*. Inicialmente, as toxinas que destroem diretamente os neurônios dopaminérgicos, como a 6-OHDA, MPTP e rotenona, foram demonstradas como capazes de ativar as células gliais e induzir alterações inflamatórias na via nigroestriatal. Esses trabalhos demonstraram que a perda neuronal dopaminérgica pode ocorrer como consequência direta da ativação microglial, que é acompanhada por aumento da formação de citocinas, maior produção de oxigênio reativo

(ROS) e espécies de nitrogênio e diminuição da secreção de fatores tróficos responsáveis pela manutenção normal da viabilidade neuronal (Hirsch e Hunot, 2009).

Indivíduos portadores da doença e modelos parkinsonianos apresentam elevação em seus níveis de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6) no estriado e na SNpc (Mogi *et al.*, 1994; Hirsch *et al.*, 1998). Esses fatores estão diretamente relacionados à geração de processos inflamatórios, e contribuem na morte de células dopaminérgicas na SNpc (Ferrari *et al.*, 2006). Além desses, a interleucina 4 (IL-4), interleucina 2 (IL-2) e diversos fatores de crescimento (EGF, TGF- α , bFGF e TGF- β) estão aumentados no líquido cefalorraquidiano (LCR; Nagatsu *et al.*, 2000). Interessantemente, não foi observado o aumento de citocinas em regiões corticais, sugerindo que essa elevação se dá apenas em regiões degenerativas da doença. Estudos pós-morte mostraram que a forma induzida da óxido nítrico sintase (iNOS) também está presente na micróglia ativada (Hirsch *et al.*, 2003) (figura 7). A iNOS é uma fonte de óxido nítrico (NO), que por sua vez pode reagir com superóxido de fontes gliais ou neuronais para formar o peroxinitrito altamente reativo e tóxico para as células.

Figura 7: Modificações em fatores relacionados à inflamação no encéfalo de pacientes parkinsonianos. CMH: complexo principal de histocompatibilidade; COX: ciclooxigenase; C. $\gamma\delta$ T: células T gama delta; IL: interleucina; iNOS: forma induzida da óxido nítrico sintase; LCR: líquido cefalorraquidiano; SN: substância negra; TNF: fator de necrose tumoral. Extraído de Hirsch e Hunot, 2009. Adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017.

Acreditava-se que a ativação glial e a mudança inflamatória fossem específicas no SNC e resultassem na morte neuronal, mas há evidências de uma reação inflamatória sistêmica na DP, sugerindo que ela seja uma causa primária da degeneração da doença em

alguns casos. Atualmente, existem indícios na literatura de uma comunicação cruzada entre a resposta inflamatória inata do SNC e o sistema imunológico periférico. Alterações em marcadores inflamatórios periféricos foram detectadas, que demonstram concentrações aumentadas de IL-2 (Stypula *et al.*, 1996), TNF- α , IL-6 (Dobbs *et al.*, 1999), osteopontina e RANTES no soro de pacientes com DP. Em particular, os níveis séricos de RANTES, uma quimiocina produzida pela micróglia ativada, foram não apenas maiores na DP quando comparados a indivíduos normais, como também correlacionaram significativamente com os escores da escala de classificação da DP Unificada (Rentzos *et al.*, 2007).

Além disso, a inflamação periférica pode aumentar os efeitos adversos das alterações inflamatórias que ocorrem na SN (Hernandez-Romero *et al.*, 2012). Não somente nos casos de DP, mas também em modelos animais que usam neurotoxinas para a degeneração dopaminérgica, o dano tecidual na SNpc é acompanhado pela presença de células do sistema imune periférico, como os monócitos, sugerindo alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Corroborando este fato, a expressão de genes e proteínas alteradas para a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), que permite a ligação entre as células ou entre células e a matriz extracelular, ocorre na DP e em modelos experimentais da doença (Miklossy *et al.*, 2006). Tais achados apoiam o conceito de que um biomarcador seletivo de sangue poderia ser desenvolvido e usado para refinar o diagnóstico clínico de DP.

Todos esses dados sugerem que uma maneira de tentar reduzir a perda celular na DP pode ser através da redução de alterações inflamatórias, e certamente isso parece funcionar em modelos experimentais. De fato, duas drogas usadas na clínica com diferentes funções (mas todas descritas com ação anti-inflamatória) - o celecoxibe, inibidor específico da enzima ciclooxigenase-2, e o canabidiol, usado no tratamento de epilepsia e com outros diversos usos na clínica experimental - foram capazes de reduzir a perda dopaminérgica em modelos experimentais da DP (Lastres-Becker *et al.*, 2005; Sánchez-Pernaute *et al.*, 2004). Contudo, o uso de anti-inflamatórios para evitar o risco da doença ainda não tem um consenso sobre sua eficácia. Apesar dos vários estudos, os resultados ainda são inconclusivos e não permitiram um consenso para nenhum modulador anti-inflamatório como uma intervenção terapêutica efetiva (Moore *et al.*, 2010; Samii *et al.*, 2009; Schiess, 2003).

O efeito positivo do uso de anti-inflamatórios pode ser relevante tanto para o início quanto para a progressão da morte neuronal, independentemente de se iniciar a nível neuronal ou glial. A importância da ativação glial na DP pode estar na sua longa duração. Tanto em

seres humanos como em primatas não humanos, a micróglia ativada pode ser detectada anos após a exposição ao MPTP, sugerindo um papel de propagação na mudança patogênica em curso (McGeer *et al.*, 2003). Por outro lado, esta ativação de longo prazo pode impedir a micróglia de desempenhar seu papel de suporte normal para a viabilidade neuronal, por exemplo, através da liberação de fatores tróficos. A aplicação de anti-inflamatórios implicaria na redução da atividade pró-inflamatória da micróglia (e possivelmente da astroglia), resultando na interrupção da morte neuronal dopaminérgica ou, pelo menos, no aumento de sua sobrevivência.

Embora a ênfase no papel da glia tenha se centrado na micróglia ativada, deve-se ter em mente que a astrocitose também ocorre na DP e pode desempenhar um papel significativo na sequência de eventos que levam à morte celular. A astroglia, ao contrário da micróglia, é conhecida por desempenhar um papel central na defesa antioxidante do encéfalo e exercer uma variedade de funções neuroprotetoras. Os astrócitos eliminam ROS liberadas pelos neurônios, evitam a excitotoxicidade do glutamato, aumentando a taxa de captação e consequente inativação desse neurotransmissor, produzem fatores que induzem enzimas antioxidantes (Dringen *et al.*, 2000, Liberatore *et al.*, 1999), e regulam o crescimento, diferenciação e sobrevivência dos neurônios, como parte das interações bidirecionais neurônio-glia. Por outro lado, os astrócitos também são capazes de responder a estímulos patogênicos através da liberação de fatores inflamatórios, como citocinas (Hirsch e Hunot, 2009). Apesar de todas estas funções, o papel dos astrócitos na DP ainda não está bem determinado. Uma compilação dos fatos inflamatórios liberados pelas células gliais e o possível mecanismo pelo qual agem está demonstrada na figura 8.

Figura 8: Possíveis mecanismos propostos para as consequências deletérias do processo neuroinflamatório na DP. A liberação de fatores pró-inflamatórios pelas células gliais e células do sistema imune que alcançam a região lesionada são capazes de levar à morte neuronal e contribuir para um *feedback* de ativação das células próximas, em um círculo vicioso. CD23 = receptor de baixa afinidade da imunoglobulina E. COX-2 = ciclooxigenase 2. IL = interleucina. IFN = interferon. iNOS = óxido nítrico sintase induzível. MCP = proteína monocitária quimioatraente. NF-κB = fator nuclear kappa B. NO = óxido nítrico. TNF = fator de necrose tumoral. TNFR = receptor do fator de necrose tumoral. Extraído de Hirsch e Hunot, 2009; modificado por dos-Santos-Pereira, 2017.

Concomitantemente, o tratamento crônico com L-DOPA também pode estar envolvido com a neuroinflamação que acontece na DP. Como os pacientes parkinsonianos geralmente estão sob tratamento de L-DOPA ou outro medicamento antiparkinsoniano no momento da morte, não se pode excluir que esses tratamentos também estejam envolvidos na reação neuroinflamatória (Bortolanza *et al.*, 2015b).

Evidências apontam que os problemas motores parkinsonianos envolvem uma resposta pós-sináptica alterada, devido à estimulação constante não fisiológica de receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos (Calon *et al.*, 2003; Chase *et al.*, 2003). A administração de L-DOPA induz o aumento extracelular transitório marcante de DA e glutamato, criando um estado pró-inflamatório nas regiões afetadas, em especial o estriado (Farber e Kettenmann, 2005). Este ambiente inflamatório poderia exacerbar qualquer processo neuroinflamatório que já estaria ocorrendo, levando a uma resposta exagerada em condições onde houver lesão

como, por exemplo, o estriado de pacientes com DP (Gao *et al.*, 2003; Cunningham *et al.*, 2005). O fato de fármacos que modulam a inflamação apresentarem efeitos benéficos sobre a sintomatologia da DP e da LID sugere que as alterações imuno-inflamatórias presentes na doença e na LID não são um acontecimento à parte da sintomatologia, mas podem estar relacionadas ao mecanismo patológico da doença (Tansey *et al.*, 2007; Barnum *et al.*, 2008).

A ERK, proteína já descrita como envolvida na manifestação da LID (ver seção 2.2) e aumentada em neurônios de projeção estriatais (que recebem aferências glutamatérgicas) pode ativar a proteína CREB e o fator nuclear-kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição amplamente envolvido na produção de citocinas e resposta inflamatória (Baldwin, 1996; Lawrence, 2009). Cada um destes elementos por sua vez pode induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (Hayden e Ghosh, 2014), que já foram demonstradas como elevadas em ratos discinéticos (Barnum *et al.*, 2008; Mulas *et al.*, 2016). Neste sentido, o tratamento com corticoides diminui a LID nesses animais (Barnum *et al.*, 2008) e reduz a atividade dos fatores de transcrição induzidos pelo tratamento com L-DOPA, ERK e CREB (Necela e Cidlowski, 2004).

Corroborando estes dados, a amantadina, uma droga classicamente utilizada na clínica para o tratamento da LID, é capaz de inibir a produção de prostaglandina E2, TNF- α e NO em modelos *in vitro* de micróglia, e aumentar a produção de fator neurotrófico derivado de células gliais (GDNF) em astrócitos, sugerindo uma diminuição do processo inflamatório na LID (Ossola *et al.*, 2011).

A enzima ciclooxigenase-2:

A ciclooxigenase (COX) é enzima passo limitante responsável pela biossíntese das prostaglandinas. Esta enzima também é conhecida como Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase. Duas isoformas desta enzima já foram bem caracterizadas nos últimos anos: a ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Estas isoformas possuem estrutura proteica similar e também compartilham sua principal função, catalisando a reação de produção de eicosanoides (Crofford, 1997; DeWitt e Smith, 1988; Kujubu *et al.*, 1991; Kulkarni *et al.*, 2000; Vane *et al.*, 1998; Xie *et al.*, 1991).

A COX-1 foi a primeira das duas isoformas a ser caracterizada e é expressa constitutivamente – isto é, está expressa nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2, por sua vez, é expressa

principalmente por células do sistema imune e/ou envolvidas na resposta inflamatória, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos e sua principal característica é ser uma isoforma induzível. Ou seja, existe a necessidade de um estímulo externo - normalmente patológico - para levar a sua expressão. A expressão desta isoforma pode ser modulada de duas formas: através da indução, pelo estímulo de citocinas (interleucina-1, interleucina-2, IL-1 β e TNF- α), fatores de crescimento, a iNOS, endotoxinas e até mesmo pela prostaglandina E2 (PGE₂), um de seus metabólitos (que promove *upregulation* desta enzima); ou através da inibição, por glicocorticoides ou citocinas, como a interleucina-4, interleucina-13 e interleucina-10 (Fitzgerald e Patrono, 2001; Jouzeau *et al.*, 1997; Kujubu *et al.*, 1991; Meade *et al.*, 1993; Morisset *et al.*, 1998; O'Banion, 1999; Vane e Botting, 1995; Xie *et al.*, 1991). Dentre os vários fatores que podem elevar a expressão de COX-2 no encéfalo, incluem-se fatores inflamatórios ou mecanismos de ativação celular, como as citocinas TNF- α , assim como a ativação do receptor de NMDA e a enzima iNOS (O'Banion, 1999).

A COX é a enzima limitante para a geração de eicosanoides. Os eicosanoides são compostos pelas prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, e são assim chamados por serem derivados de ácidos graxos essenciais de vinte carbonos esterificados presentes em fosfolipídios da membrana celular. A síntese dos eicosanoides pode ser desencadeada por diversos ligantes que ativem receptores de membrana acoplados à proteína G, resultando na ativação da enzima fosfolipase A2 e elevação da concentração intracelular do Ca²⁺. A fosfolipase A2 hidrolisa fosfolipídios de membrana, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando desta forma o ácido araquidônico (Carvalho, 2002; Carvalho e Lemonica; 2000; Chandrasekharan *et al.*, 2002; Janeway *et al.*, 2001; Morrow *et al.*, 1992).

O ácido araquidônico produzido é utilizado como substrato para a produção dos eicosanoides, que são produzidos a partir de duas vias distintas: a via das lipooxigenases, responsável pela síntese de leucotrienos (contribuintes da constrição da musculatura lisa e na resposta de inflamação aguda), lipoxinas e outros compostos; e a via das ciclooxygenases, que leva à produção de prostaglandinas/prostaciclina (mediadoras do processo inflamatório e de reações anafiláticas) e dos tromboxanos (mediadores da vasoconstrição) (Carvalho, 1990a; 1990b; Samuelsson *et al.*, 1975; 1980) (figura 9).

Figura 9: Cascata do ácido araquidônico e produção de prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos a partir das enzimas ciclooxygenase e lipooxigenase. Extraído de Hilário *et al.*, 2006. Adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017.

Bioquímica da ciclooxygenase e síntese de prostaglandinas: A COX-1 e a COX-2 são proteínas que se localizam na parte interna da bicamada fosfolipídica. Para a síntese de prostaglandinas, duas etapas são necessárias após a ativação desta enzima: a primeira envolve sua atividade de endoperóxido redutase, que leva à oxidação e formação de um ácido graxo cíclico a partir de um precursor não-esterificado, formando o endoperóxido cíclico prostaglandina G (PGG); e a segunda etapa se trata de uma outra atividade peroxidase, que converte o PGG em prostaglandina H (PGH), através de um processo de redução de elétrons.

As PGG e PGH apresentam pouca função celular e servem como substrato para a formação de diferentes eicosanoides ativos, como as prostaglandinas PGD₂, PGE₂, PGF_{2α}, a prostaciclina PGI₂ e o tromboxano TXA₂ (DeWitt e Smith, 1988; Crofford, 1997; Jouzeau *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 2000; Kurumbail *et al.*, 1996; Needleman, 1994) (figura 10). Como os eicosanoides são o principal produto biologicamente ativo desta via, e porque COX-2 é essencial para a geração dos eicosanoides, a atividade da via parece ser regulada por um mecanismo de *feedback* negativo autônomo, com a expressão de COX-2 regulando a produção das prostaglandinas e vice-versa (Carvalho *et al.*, 2004).

Figura 10: Produção de prostaglandinas pelas COX e suas diversas funções no organismo. Extraído de Batlouni, 2010; adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017.

As prostaglandinas, uma vez sintetizadas, ligam-se a receptores prostanoídes que estão localizados na membrana celular, acoplados à proteína G. A ativação da proteína G resulta na estimulação de cascatas intracelulares responsáveis pela produção de segundos mensageiros em diversos tecidos. Estes receptores foram divididos em cinco grupos, baseado na prostaglandina com os quais eles possuem maior afinidade. Estes receptores são DP (PGD₂), FP (PGF₂), IP (PGI₂), TP (PXA₂) e EP (PGE₂). Apesar de a maioria dos receptores de prostaglandinas serem receptores de superfície da membrana, alguns podem estar localizados na membrana nuclear, cujos ligantes atuam como fatores de transcrição, levando a modificações na expressão gênica celular (Carvalho *et al.*, 2004).

Pelo menos dois sistemas de sinalização intracelular que atuam via liberação de segundos mensageiros têm sido associados à ação das prostaglandinas. Um deles é o da adenilil ciclase, cuja ativação estimula a síntese de AMPc. As PGI₂, PGE₂ e PGD₂ ativam esta enzima, aumentando a concentração de AMPc, enquanto o TXA₂ reduz esta atividade. Outro sistema de sinalização é o da fosfolipase C que, quando ativada pelas prostaglandinas, aumenta a formação de diacilglicerol e inositol 1,4,5-trifosfato, resultando na ativação em cascata de proteínas quinases e elevação do Ca²⁺ intracelular (Carvalho, 2002; Coleman *et al.*, 1994; Graziano e Gilman, 1987; Morrow *et al.*, 1992). De modo interessante, ambos os sistemas efetores estão amplamente descritos como participantes na manifestação da LID

(Calabresi *et al.*, 2008; Feyder *et al.*, 2011; Gan *et al.*, 2015; Ruiz-DeDiego *et al.*, 2015a; Rylander *et al.*, 2009; Santini *et al.*, 2010; Schuster *et al.*, 2009).

A expressão de uma terceira isoforma da COX (COX-3) foi demonstrada por diversos grupos em estudos *in vitro* (Chandrasekharan *et al.*, 2002; Colville-Nash *et al.*, 1998; Gilroy *et al.*, 1998). Atualmente, sabe-se que esta isoforma da enzima está expressa principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e no coração (Chandrasekharan *et al.*, 2002). Foi hipotetizado que a COX-3, surpreendentemente, não sintetizaria prostaglandinas pró-inflamatórias, mas em vez disso, seria responsável pela produção de uma prostaglandina de ação anti-inflamatória, a PGI₂, agonista dos receptores ativadores de proliferação do peroxissomo (PPARs) (Colville-Nash *et al.*, 1998; Gilroy *et al.*, 1998; 1999; Jiang *et al.*, 1998; Ricote *et al.*, 1998; Willoughby *et al.*, 2000). Baseado nisso, supõe-se que a sua expressão pode resultar em períodos típicos de remissão do processo inflamatório, como tem sido constatado em algumas doenças crônicas, como a artrite reumatoide.

Funções fisiológicas e patológicas das ciclooxigenases/prostaglandinas: As prostaglandinas fazem parte de diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, por exemplo, vasodilatação ou vasoconstrição; contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina; hipotensão; ovulação; metabolismo ósseo; aumento do fluxo sanguíneo renal; crescimento e desenvolvimento nervoso; resposta imunológica; resposta endócrina; angiogênese, dentre outras (Carvalho, 1990a; 1990b; 2002; Carvalho e Lemonica, 2000; Ferreira e Vane, 1979; Fisher *et al.*, 1978; Moncada *et al.*, 1978; Moncada e Vane, 1978; Piper e Vane, 1971; Willoughby *et al.*, 2000).

As prostaglandinas também podem ser sintetizadas em neurônios e vasos do SNC. Elas estão envolvidas em várias funções cognitivas, incluindo o controle do ciclo do sono e do despertar, aprendizado espacial e a transmissão nociceptiva (Tassoni *et al.*, 2008). As prostaglandinas também estão implicadas na fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer, esclerose múltipla, demência associada à síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) e na própria DP, que será discutida posteriormente (Crofford, 1997; Cryer e Dubois, 1998; Jouzeau *et al.*, 1997; Kulkarni *et al.*, 2000; Kurumbail *et al.*, 1996).

Ações não-inflamatórias da COX-2 no encéfalo: Sabe-se que a COX-2 é constitutivamente expressa em diversos neurônios e que estímulos inflamatórios como o lipopolissacarídeo (LPS) e as citocinas podem promover a indução de COX-2 em várias regiões do encéfalo. De

maneira interessante, a COX-2, apesar de sua função inflamatória clássica na periferia e de ser expressa em algumas áreas após estímulos inflamatórios, é expressa constitutivamente em algumas regiões do encéfalo, destacando-se principalmente o córtex, hipocampo, complexo amígdala-hipocampo, hipotálamo e medula espinhal. De maneira consistente, Teismann *et al.* (2003) descreveu que a COX-2 se torna expressa na maior parte dos neurônios após uma variedade de insultos e, em menor intensidade, em astrócitos, micróglia e células endoteliais (Hurley *et al.*, 2002).

A enzima COX-2 pode estar envolvida em funções celulares que não envolvem necessariamente respostas inflamatórias. Por exemplo, esta enzima também pode funcionar como um gene de resposta imediata (Bazan e Allan, 1996; Crofford, 1997; Lanahan e Worley, 1998; Maier *et al.*, 1990). Esta informação é consistente com a noção original de que os genes de resposta imediata funcionam como parte de um programa hierárquico para regular as respostas celulares de longo prazo (Lau e Nathans, 1987). Como exemplo de ação de gene de resposta imediata, a COX-2 pode desempenhar um papel na sinalização de glutamato e vice-versa (Kaufmann *et al.*, 1996).

O RNAm da COX-2 - ou sua proteína - nas áreas do encéfalo onde são expressas normalmente estão presentes exclusivamente em neurônios excitatórios, como os neurônios glutamatérgicos (Kaufmann *et al.*, 1997), principalmente nos espinhos dendríticos os dendritos distais. A COX-2, quando expressa constitutivamente no encéfalo, regula diversas funções cognitivas e está envolvida na alteração de resposta de disparo neuronal, que inclui formação de potenciação e depressão de longo prazo (LTP e LTD), além de terem função na plasticidade sináptica.

Dentre os vários fatores que podem elevar a expressão de COX-2 no encéfalo, incluem-se fatores não necessariamente inflamatórios, como a ativação do receptor de NMDA (O'Banion, 1999). No encéfalo de ratos, a COX-2 é rapidamente regulada em neurônios encefálicos em resposta à ativação sináptica do receptor NMDA (Yamagata *et al.*, 1993). Devido a um maior nível de expressão de COX-2 nos neurônios do hipocampo e cortical envolvidos na função cognitiva, acredita-se que a COX-2 participa da plasticidade neural nestas regiões. Além de sua ativação via glutamato, a expressão de COX-2 também é regulada positivamente por estimulação de alta frequência associada à indução de LTP, uma forma de plasticidade sináptica e modelo celular de aprendizagem e memória (Bliss e Collingridge,

1993). Este dado sugere que o nível de expressão e a atividade da COX-2 nestas regiões podem estar ligados à plasticidade sináptica de longo prazo.

Também foi descrito que os inibidores seletivos da COX-2, mas não os da COX-1, reduzem a LTP induzida por estimulação de alta frequência nas sinapses das células granulares do giro denteado no hipocampo (Chen *et al.*, 2002). Este estudo forneceu a primeira evidência direta de que a COX-2 está envolvida na plasticidade sináptica de longo prazo do hipocampo. O envolvimento da COX-2 no LTP hipocampal foi confirmado por estudos que demonstram que a inibição da COX-2 suprime tanto a LTP quanto a LTD no hipocampo (Murray e O'Connor, 2003; Slanina *et al.*, 2005). Através da técnica de RNA de interferência (RNAi), Akaneya e Tsumoto (2006) relataram que a redução da COX-2 no córtex visual abole quase completamente a formação de LTP, enquanto o silenciamento de genes para COX-1 não induz efeitos significativos na indução ou manutenção de LTP. A especificidade da correlação LTP/COX-2 é consistente com os resultados relatados por Chen e Bazan (2005), que demonstraram que a LTP formada na via perfurante do hipocampo em camundongos *knockout* para COX-1 é normal quando comparada a de animais controle.

Esses achados com base na inibição da COX-2 por inibidores seletivos ou supressão do gene COX-2 indicam que esta enzima, quando expressa constitutivamente, participa na plasticidade sináptica de longo prazo. Outros estudos revelaram que a PGE₂, um dos metabólitos ativos da COX-2, também são fundamentais para a ação da enzima na modulação da atividade neuronal, uma vez que a PGE₂ endógena regula a excitabilidade da membrana e a transmissão sináptica nos neurônios piramidais CA1 do hipocampo. Sob a condição de depleção de PGE₂ endógena, a resistência de entrada da membrana (isto é, a variação da voltagem na membrana) e a frequência de disparo foram significativamente reduzidas (Chen e Bazan, 2005).

COX-2, DP e LID:

A COX-2 é uma enzima que também possui ação ampla no quadro de neuroinflamação na DP. Quando há a neuroinflamação característica da doença, essa enzima pode ser rapidamente sintetizada, podendo ser considerada uma das responsáveis pela degeneração neural da DP (figura 11; Hirsch e Hunot, 2009). É interessante notar que a síntese da PGE₂ (descrita anteriormente como uma das vias estimulatórias na produção de interleucinas) possui como enzima limitante da reação a COX-2, estando ambas aumentadas

em indivíduos com a DP e modelos animais parkinsonianos (Almer *et al.*, 2001; Andreasson *et al.*, 2001; Nogawa *et al.*, 1997).

Figura 11: Mecanismos envolvidos na neurodegeneração dependentes da ativação de COX-2. Além de sua função canônica de síntese de prostaglandinas, a enzima COX-2 também participa da síntese de radicais livres, que levam a danos oxidativos e consequentemente ao processo de neurodegeneração característica da DP. Extraído de Gonçalves *et al.*, 2009. Adaptado por dos-Santos-Pereira *et al.*, 2017.

Entretanto, relatos na literatura sugerem que a COX-2 teria papel pró-inflamatório na fase inicial do processo inflamatório da doença (*Polimorphonuclear leucocytes-dominated phase*). Na fase tardia (*Migrating mononuclear phase*), a COX-2 teria ação anti-inflamatória, além de estar relacionada à geração de novos mediadores lipídicos com ação neuroprotetora. Alguns estudos também apontam funções fisiológicas importantes desta enzima que poderiam estar envolvidas com a doença, como atividade sináptica, formação de LTP e LTD e consolidação da memória, entre outros, discutidos anteriormente (Adams *et al.*, 1996; Aid e Bosetti, 2011; Kaufmann *et al.*, 1996; Yamagata *et al.*, 1993).

A PGE₂ pode interagir com diferentes receptores de prostaglandina (EP), intermediando assim a neurodegeneração (Teismann, 2012). Dos receptores descritos até o momento, apenas o receptor EP2 foi estudado em um modelo de DP. A ativação microglial e a neurotoxicidade causada pela PGE₂ parecem ser mediadas pelo EP2, uma vez que camundongos deficientes para EP2 apresentaram proteção contra a toxicidade induzida por MPTP (Jin *et al.*, 2007). De forma complementar, a EP2 microglial aumentou a depuração da

α -sin nas secções de tecido obtidas de pacientes com doença do corpo de Lewy. O receptor EP2 também foi descrito como protetor contra a toxicidade 6-OHDA em um modelo de cultura celular (Carrasco *et al.*, 2005). Entretanto, devido ao fato de o receptor EP2 ser expresso principalmente pela micróglia e no modelo do trabalho citado e este tipo celular não estar presente na cultura, é preciso considerar que o estudo posterior possa não descrever de forma confiável um efeito que poderia ser reproduzido *in vivo*. Também foi descrito que o LPS não induz neurotoxicidade secundária em meio condicionado de micróglia *knockout* para EP2, sugerindo um papel importante para este receptor em reações inflamatórias e neurotoxicidade mediada por LPS (Shie *et al.*, 2005).

Dados prévios do nosso grupo mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA também é capaz de promover o aumento de marcadores pró-inflamatórios, como a COX-2 no estriado lesionado de roedores (Bortolanza *et al.*, 2015b), juntamente ao aumento de células gliais no estriado lesionado, micróglia e astrócitos (Bortolanza *et al.*, 2015a). Em ambos os casos, o inibidor da enzima oxido nítrico sintase 7-Nitroindazol conseguiu diminuir a expressão desses marcadores inflamatórios. Entretanto, pouquíssimos estudos até o momento apresentaram dados conclusivos correlacionando a manifestação da LID a um quadro neuroinflamatório no estriado lesionado. E, mais importante, até o momento nenhum trabalho demonstrou que a inibição da COX-2 pode ser uma importante ferramenta terapêutica para a redução da LID. Baseado nisso, ainda não é possível afirmar se o surgimento da COX-2 no estriado de modelos experimentais está necessariamente envolvido com um processo neuroinflamatório e envolve a produção de outros fatores, como citocinas. E, principalmente, se seu surgimento está envolvido com a manifestação da LID ou, ao contrário, seria uma resultante da manifestação crônica desta patologia.

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

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS:

2.1) Objetivo geral

De forma geral, o trabalho busca investigar se a LID é consequência, dentre outros fatores, de um quadro inflamatório ocorrente no estriado lesionado que depende da produção da enzima COX-2 após o tratamento prolongado com L-DOPA. Para tal, caracterizaremos o padrão de expressão desta enzima, as células que a produzem e a produção de fatores inflamatórios derivados da COX-2 na LID. Também, se anti-inflamatórios aplicados na clínica como o canabidiol (princípio ativo da *Cannabis*, usado no tratamento para epilepsia) e o celecoxibe (Celebra; inibidor específico da atividade enzimática da COX-2) são eficazes na redução da LID e dos fatores inflamatórios associados a esse quadro patológico.

2.2) Objetivos específicos

Para melhor compreensão dos dados, os objetivos específicos do trabalho foram divididos em três partes:

- **Parte 1 – Curva Temporal da LID e análise de fatores inflamatórios:**

1) *Verificar a expressão temporal da proteína COX-2 em camundongos:* Analisamos a expressão da enzima COX-2 no estriado lesionado de camundongos hemiparkinsonianos submetidos ao tratamento crônico com L-DOPA. Foi avaliado a partir de qual ponto da curva temporal existe a expressão de COX-2 em animais tratados com L-DOPA. Estabelecemos também uma correlação entre o nível de expressão da enzima e grau de LID desenvolvida pelos animais ao longo dos dias analisados.

2) *Analisar a expressão glial ao longo da curva temporal de tratamento com L-DOPA:* Considerando a participação de células gliais (astrócito e micróglia) no processo de neuroinflamação e sua importância na síntese de fatores pró-inflamatórios, verificamos se existe também uma modificação na expressão dessas células gliais ao longo de tratamento com L-DOPA e se essa modificação acompanha o padrão da expressão de COX-2.

3) *Caracterizar as áreas estriatais onde surge a COX-2 e os tipos celulares produtores da enzima:* A enzima COX-2 não é constitutiva no estriado, diferindo de estruturas como o córtex e o hipocampo. O estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA foram utilizados para caracterizar o surgimento de COX-2 no estriado e, também, em quais tipos celulares a enzima COX-2 é produzida. Além disso, tivemos como objetivo

confirmar se a produção de COX-2 é dependente de neurônios, como descrito em ratos (Bortolanza *et al.*, 2015b) ou por células gliais, como astrócito e micróglia.

4) *Avaliar a produção de PGE₂ induzida por L-DOPA no estriado lesionado de camundongos*: Considerando a cascata de ativação da COX-2 e a importância das prostaglandinas no processo inflamatório e em funções cognitivas do SNC, animais lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA foram avaliados no estriado lesionado quanto à produção de PGE₂ e comparados a animais controle.

- **Parte 2 – O efeito da L-DOPA/DA ou glutamato sobre a atividade glial – um estudo *in vitro*:**

5) *Verificar se a L-DOPA/DA é capaz de alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias em células gliais, como micróglia e astrócitos*: Considerando uma possível alteração glial após o tratamento com L-DOPA (Bortolanza *et al.*, 2015a; Mulas *et al.*, 2016), verificamos se o estímulo com L-DOPA ou DA nessas células poderia influenciar sua ativação e a produção de fatores produzidos por células ativadas, como citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e glutamato, utilizando para tal culturas purificadas de astrócitos e micróglia.

6) *Verificar se o glutamato per se é capaz de alterar a produção de citocinas pró-inflamatórias em células gliais como micróglia e astrócitos*: Uma vez que a L-DOPA/DA são capazes de alterar a comunicação glutamatérgica no encéfalo “discinético” (Ahmed *et al.* 2011; Huot *et al.* 2013; Morin e Di Paolo 2014; Rylander *et al.* 2009), verificaremos se o estímulo de glutamato em culturas purificadas também poderia influenciar a ativação celular e produção de fatores inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6.

- **Parte 3 – Ação de fármacos anti-inflamatórios sobre a LID.**

7) *Investigar o efeito do anti-inflamatório canabidiol e do inibidor específico da COX-2 celecoxibe sobre a LID em animais hemiparkinsonianos*: Para observar se o tratamento sub crônico com anti-inflamatórios poderia atenuar a LID, grupos experimentais de camundongos hemiparkinsonianos foram tratados com L-DOPA. Após o tratamento com 21 dias e a LID devidamente estabelecida, os animais passaram por um tratamento sub crônico (5 dias) com o fármaco anti-inflamatório canabidiol ou com o inibidor específico da enzima COX-2 (celecoxibe) concomitantemente ao tratamento com L-DOPA e os AIMS foram quantificados.

8) *Investigar o efeito dos anti-inflamatórios sobre a expressão de fatores inflamatórios, células gliais e fatores classicamente associados à LID em camundongos*

discinéticos: Após o tratamento sub crônico com os anti-inflamatórios e a quantificação dos AIMS, os animais foram sacrificados e o estriado lesionado foi utilizado para observar a expressão dos compostos inflamatórios COX-2 e seu metabólito ativo PGE₂, genes de resposta imediata classicamente associados à LID (FosB e p-AcH3) e células gliais (micróglia e astrócitos) para confirmar se o tratamento resultaria em uma redução dos fatores inflamatórios associados à LID.

3. MATERIAL E MÉTODOS:

3.1) Estudos *in vivo* (partes 1 e 3):

Animais: Foram utilizados camundongos C57/Black (machos, com aproximadamente 2 meses de idade, 18-27g), originários do Biotério Central do campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos à temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) sob um ciclo claro-escuro de 12 horas, com início do período claro às 07:00h. Água e comida foram fornecidas *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas do COBEA para cuidado e uso de animais de laboratório. Todos os procedimentos experimentais descritos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP- USP, número do protocolo 2013.1.997.58.1).

Drogas:

- 6-hidroxidopamina (6-OHDA, 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de solução salina 0,9%, contendo 0,02% de ácido ascórbico);
- Amoxicilina (5 mg/ml, diluída em água potável);
- Apomorfina (0,5 mg/kg, diluída em salina 0,9% a 4 ml/kg s.c.);
- Araquidonoil serotonina (AA-5-HT; 5 mg/kg diluída em 10% DMSO-salina 0,9% a 10 ml/kg i.p.);
- Canabidiol (CBD; 15, 30 e 60 mg/kg diluído em 2% Tween 80-salina 0,9% a 10 ml/kg i.p.);
- Capsazepina (CPZ; 1 e 5 mg/kg diluído em 50% DMSO-salina 0,9% a 10 ml/kg i.p.);
- Celecoxibe (Celec; 1, 5 e 10 mg/kg, diluído em 5% etanol absoluto-salina 0,9% a 10 ml/kg i.p.);
- Indometacina (Indo; 10 mg/kg diluída em Tris-HCl 1M, p.H. 7.5 a 10 ml/kg i.p.);
- L-DOPA (25 mg/kg + Benserazida-HCl 10mg/kg diluídos em salina 0,9% a 10 ml/kg i.p.);
- Tribromoetanol (250 mg/kg diluído em salina 0,9% a 10ml/kg i.p.);

3.2) Metodologia (partes 1 e 3):

- **Cirurgia:**

Lesão Unilateral do Estriado: A lesão induzida pela 6-OHDA foi baseada em estudo descrito por Pavón *et al.* (2006) e Tavares (Dissertação de Mestrado, 2013). Os camundongos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg), fixados no aparelho estereotáxico e receberam 10 µg de 6-OHDA (Sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA) dissolvida em 4 µl de salina 0,9% contendo 0,02% de ácido ascórbico. Duas microinjeções de 2 µl foram infundidas a uma velocidade de 0,5 µl/min no estriado dorsolateral, seguindo as seguintes coordenadas: anteroposterior (AP) = -0,5 mm a partir do bregma; laterolateral (LL) = -2,3 mm em relação a linha média; dorsoventral (DV) = -4,0 e -3,0 a partir do crânio (Paxinos e Franklin, 2001). A agulha de injeção era mantida por um período adicional de 5 min para evitar o refluxo da droga. Ao término do procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos aquecidos por uma lâmpada de 60W até completa recuperação da anestesia e então receberam por 7 dias o antibiótico amoxicilina (5 mg/ml) via oral.

Implantação de cânula e microinjeção: A implantação de cânula foi feita baseada no trabalho de Issy *et al.* (2009). Optou-se pela implantação de cânula no ventrículo lateral por se tratar de uma região líquórica, que permite a difusão das drogas para estruturas próximas como os núcleos da base. Os camundongos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg i.p.) e fixados no aparelho estereotáxico (David Kopf-USA). Foi implantada uma cânula-guia de aço inoxidável (0,7 mm de diâmetro) voltada para o ventrículo lateral ipsilateral à lesão (coordenadas: AP = -0,4 mm de bregma, LL = -1,0 mm, DV = -2,0 mm; Franklin e Paxinos, 1997) para posterior microinjeção i.c.v. A cânula foi anexada aos ossos com parafusos de aço inoxidável e resina acrílica. Um obturador dentro da cânula guia impediu sua obstrução. Os procedimentos pós-cirúrgicos foram os mesmos descritos anteriormente.

Cinco dias após a cirurgia, as microinjeções foram realizadas com uma agulha dental (0,3 mm de diâmetro) que foi introduzida através da cânula guia até sua ponta a 1 mm abaixo da extremidade da cânula. Um volume de 1 µl foi injetado em 2 min (0,5 µl/min) usando uma microseringa de vidro de 10 µl (Hamilton Syringe 701N 10UL) com uma bomba de infusão (Scientific, EUA) e a agulha dental foi mantida por um período adicional de 1 min para evitar refluxo. Um cateter de polietileno (PE10) foi interposto entre a extremidade superior da agulha dental e a microseringa para a aplicação da droga. O movimento de uma bolha de ar dentro do cateter de polietileno confirmou o fluxo da droga.

- **Análise Comportamental:**

Rotação Induzida Por Apomorfina: Realizado três semanas após a lesão unilateral do estriado, sua análise consistiu em observar e quantificar o número de giros de 360 graus no sentido contralateral à lesão durante 45 min após a administração subcutânea de apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.). A apomorfina (agonista dopaminérgico) é utilizada para estimular farmacologicamente os neurônios pós-sinápticos do estriado e consequentemente gerar movimento. Considerando a perda de terminais pré-sinápticos associada a um *upregulation* dos receptores dopaminérgicos no lado ipsilateral à lesão, resultante da aplicação de 6-OHDA, a estimulação do lado supra regulado leva a um comportamento rotatório contralateral à lesão, indicando que houve perda de neurônios dopaminérgicos nesses animais. Os animais que não atingiram os critérios de seleção (≥ 3 rotações contralaterais/min; Iancu *et al.*, 2005) foram excluídos do estudo.

Teste do Uso Assimétrico da Pata Dianteira (Cilindro): Foi utilizado o teste do cilindro para avaliar a assimetria do uso de patas dianteiras durante a atividade exploratória. O teste baseia-se na habilidade inata dos animais para explorar um ambiente novo de pé sobre as patas traseiras e inclinando-se para as paredes do cilindro. Três semanas após a microinjeção com 6-OHDA, os camundongos foram colocados individualmente em um cilindro de vidro (7 cm de diâmetro, 25 cm de altura) e analisados durante o período de 5 min. Não houve qualquer tipo de habituação ao cilindro. Contatos no cilindro das patas dianteiras foram contados e expressos em porcentagem de utilização dos membros anteriores (ipsilaterais ou contralaterais) em relação ao total utilizado de membros anteriores (ipsilateral + contralateral + uso simultâneo).

Tratamento dos animais com L-DOPA e análise de Movimentos Involuntários Anormais: Os camundongos lesionados foram tratados com L-DOPA (25mg/kg + benserazida 10 mg/kg i.p.) por 21 dias intraperitonealmente duas vezes ao dia, a primeira dose ocorrendo aproximadamente às 9:00h e a segunda às 16:30h. Nos dias de análise de LID (dias 1, 7, 14 e 21 do tratamento), os animais só receberam uma dose de L-DOPA antes do início do teste para não haver variação entre os grupos.

A avaliação da LID foi realizada com base no sistema de escores de AIMS, descrita na literatura (Pavón *et al.*, 2006) e caracterizada pelo grupo. Os animais foram colocados individualmente em cilindros transparentes medindo 20 cm de altura e 12 cm de diâmetro colocado sobre uma base de madeira revestida de fórmica branca e posicionado em frente a dois espelhos num ângulo de 90°. Cada um dos AIMS foi analisado durante 120 segundos nos

tempos de 2, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min após a administração de L-DOPA. O processo foi realizado nos dias 1, 7, 14 e 21 do tratamento com L-DOPA para confirmação de desenvolvimento de AIMs. No caso de análise com fármacos que poderiam alterar os AIMs, também houve análise nos dias 22, 24 e 26. Foram analisados quatro tipos de movimentos involuntários que tiveram sua intensidade pontuada: (i) distonia axial: desvio lateral ou torção da cabeça, pescoço e tronco para o lado contralateral à lesão; (ii) discinesia do membro anterior: movimentos de flexão-extensão, abdução-adução ou movimento circular do membro anterior contralateral à lesão. Inclui abertura/fechamento dos dígitos e pronação ou supinação do punho. (iii) discinesia orofacial: abertura de mandíbula, podendo ser acompanhada por protrusão lingual; (iv) discinesia locomotora: locomoção circular para o lado contralateral à lesão (figura 12).

Figura 12: Categorias de AIMs em camundongos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA. (A) Imagens representativas ilustrando os AIMs orofaciais observados 30 min após a administração de L-DOPA (25 mg/kg i.p., 2x/dia). A protrusão da língua ocorre como um sintoma da discinesia orofacial; os movimentos de abertura e fechamento mandibular ocorrem com mais frequência que a protrusão da língua. (B) AIMs dos membros anteriores contralaterais à lesão, com abertura e fechamento de dígitos até o movimento circular de todo o membro anterior contralateral à lesão. (C) AIMs locomotores, manifestada como uma tendência a mover de forma circular para o lado contralateral à lesão. (D) Distonia axial do tronco em direção ao lado contralateral, com torção da cabeça e, em casos mais intensos, do tronco até a queda do animal. AIMs: movimentos involuntários anormais. Retirado de Pavón *et al.*, 2006. Adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017.

Escore de 0-4 foram atribuídos de acordo com o tempo de incidência de cada um dos quatro subtipos de movimentos analisados: (0) – ausente; (1) – presença de movimentos

bruscos e isolados; movimentos involuntários ocasionais presentes durante menos do que 50% do tempo de observação; (2) – presença intermitente e frequente de movimentos repetitivos; movimentos involuntários frequentes presentes durante mais do que 50% do tempo de observação; (3) – movimentos repetitivos ou distônicos contínuos interrompidos por estímulo sensorial importante, que pode ser auditivo, visual ou tátil; (4) - movimentos repetitivos ou distônicos compulsivos não interrompidos por estímulo sensorial importante. Escores intermediários (0,5; 1,5; 2,5 e 3,5) também foram atribuídos.

Teste de campo aberto: O teste teve como principal objetivo verificar se o efeito antiparkinsoniano do tratamento crônico com L-DOPA seria afetado pelos fármacos que poderiam alterar a manifestação da LID. O campo aberto consistiu em uma arena circular de plexiglas (40 cm de diâmetro), com paredes de 40 cm de altura. Os animais foram colocados no centro da arena e a distância total percorrida, velocidade média e o tempo de imobilidade foram determinados durante 10 min usando o software ANYMAZE (Stoelting Co, Ranelagh, Dublin, Irlanda).

- **Análise molecular:**

Imunohistoquímica: Avaliamos os níveis de expressão das proteínas tirosina hidroxilase (anti-TH; 1:2000), proteína glial fibrilar ácida (anti-GFAP; 1:1000), molécula adaptadora de ligação ao cálcio 1 (anti-Iba-1; 1:400), FosB/ Δ FosB (anti-FosB; 1:1000), fosfo-Histona acetilada (anti-p-AcH3; 1:1000) e ciclooxygenase 2 (anti-COX-2; 1:600) através da técnica de imunohistoquímica. Os animais passaram por processo de deslocamento cervical, tiveram seus encéfalos retirados e postas em solução de paraformaldeído 4% para fixação por 48h. Após esse período, os encéfalos foram imersos em sacarose 30% até ficarem saturados, quando foram congelados em isopentano (-40°C). Os encéfalos foram cortados no criostato e a avaliação da expressão das proteínas descritas acima foi detectada em cortes com espessura de 25 μ m representativos do estriado. Anteriormente à incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram submetidas à recuperação gênica induzida pelo calor, onde as mesmas foram imersas em solução de tampão citrato 0,05M, p.H. 6,0, mantidas em banho-maria a 60°C durante 30 min e incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 0,5% para eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas. Após bloqueio com soro específico 5% e BSA 2%, os anticorpos primários foram diluídos em tampão fosfato salino (PBS) + 0,15% Triton X (Tampão A) e adicionados nos cortes teciduais, sendo mantidos de 24-48h a uma temperatura de 4°C sob leve agitação constante. Após lavagem dos cortes em Tampão A, estas foram

incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM coelho/camundongo conjugado com um polímero de peroxidase (Em Vision Plus, Dako, EUA), em agitação constante e lenta por 2 horas, à temperatura ambiente. As amostras foram submetidas a revelação colorimétrica, com peróxido de hidrogênio a 0,15% de 3,3'-diaminobenzidina (DAB). O resultado positivo foi revelado pelo aparecimento de coloração castanha no local da marcação pelos anticorpos. Para o caso de antígenos de difícil marcação, como FosB, p-Ach3 e COX-2, os mesmos foram revelados juntamente à presença de sulfato de níquel. As imagens foram adquiridas com microscópio LEICA® DM6 B e a análise das reações imunohistoquímicas foi realizada através do programa de análise Image J (National Health Institute, EUA). Para a análise, as secções estriatais rostral, medial e caudal foram utilizadas (figura 13).

Figura 13: Regiões e áreas analisadas do estriado de camundongos. Representação ilustrativa das secções analisadas para análise no estriado rostral (A), medial (B) e caudal (C). Dentro de cada secção, o estriado foi subdividido em quadrantes (áreas) utilizados para quantificação no trabalho. As áreas analisadas para cada secção foram: secção rostral - áreas dorsomedial, dorsolateral e ventral; secção medial - áreas dorsomedial, ventromedial, dorsolateral e ventrolateral; caudal - áreas dorsolateral e ventrolateral. Retirado de Paxinos e Franklin, 2001. Adaptado por dos-Santos-Pereira, 2017.

Quantificação de células microgliais reativas: considerando os estados de ativação da micróglia, reativas ou quiescentes, também foi realizada uma avaliação quantitativa da morfologia dessas células. As células foram classificadas em micróglia em repouso ou reativa de acordo com os critérios morfológicos estabelecidos por Gomes *et al.* (2015) e outros (Diz Chaves *et al.*, 2012; Lopez-Rodriguez *et al.*, 2015). Células com poucos processos celulares (2 ou menos) ou células com poucos ramos curtos foram consideradas como quiescentes; Células com numerosos processos celulares longos, grandes corpos celulares e processos retraídos e mais espessos, e células com corpo celular ameboides, processos curtos e imunomarcação para Iba-1 intensa foram considerados como micróglia reativa.

Imunofluorescência: Após a fixação do tecido, os tecidos passaram por incubação em solução de glicina 0,1M por 40 min (para bloqueio de grupos aldeídos), recuperação

antigênica (similar à de imunohistoquímica), e então foram incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 0,3% e em seguida por um bloqueio de soro específico 5% + BSA 2%, para eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas. Após o processo, foram incubados com os seguintes anticorpos para dupla marcação: camundongo anti-NeuN (1:500 em PBS com Triton-X 0,3% durante 48h; Millipore), cabra anti-Iba-1 (1:500 em PBS-Triton 0,3% durante 48h; Abcam), camundongo anti-GFAP (1:1000 em PBS-triton 0,3% durante 48h; Sigma), e então em coelho anti-COX-2 (1:500 em PBS-Triton 0,3% durante 48h; Cell Signaling). Quando realizada a dupla marcação dos anticorpos com COX-2, a detecção de COX-2 era realizada após a dos tipos celulares. Como anticorpos secundários, utilizamos Cy3 de burro anti-cabra ou burro anti-camundongo e FITC para cabra anti-coelho. As imagens fluorescentes foram obtidas utilizando o microscópio LEICA® DM6-B e o software de imagem Leica LAS-X.

Coleta de tecidos e extração de proteínas para ELISA e Western Immunoblot: Os animais passaram por deslocamento cervical, foram decapitados e tiveram as estruturas encefálicas dissecadas. As amostras foram homogeneizadas em tampão de lise (Tris-HCl 20 mM p.H. 8,0; NaCl 137 mM, 10% glicerol) complementado com inibidores de protease (10% v/v; Sigma) e fosfatase (Roche), centrifugadas a 4°C (10000 rpm por 10 min, para quantificação por Western Immunoblot e ELISA) e imediatamente mantidas em gelo. O sobrenadante foi então recolhido e armazenado a -80°C até o momento da quantificação.

Western Immunoblot: Os sobrenadantes foram recuperados para medições de concentração de proteína utilizando ensaio de Bradford (ensaio Bio-Rad Protein, Bio-Rad, Alemanha). As proteínas (50µg) foram corridas por eletroforese em gel de poliacrilamida de dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE a 10%) e transferidas a semi-seco para uma membrana de nitrocelulose. As membranas de nitrocelulose após bloqueio com caseína 5% e BSA 1% foram incubadas a 4°C durante a noite utilizando o anticorpo anti p-ERK 1/2 (1:500, Millipore, Darmstadt, Alemanha), anti-NF-κB p65 (1:500, Cell Signaling Technology, USA), e anti-α-tubulina como controle (1:5000, Cell Signalling Technology, EUA). Os anticorpos ligados foram detectados com anticorpo anti-coelho secundário conjugado com HRP (1:4000). As bandas foram visualizadas por quimioluminescência (ECL, Amersham, UK) e quantificadas com o software IMAGEJ (dos-Santos-Pereira *et al.*, 2015). As unidades arbitrárias (U.A.) representaram a análise de densidade integrada extraída das intensidades de banda de NF-κB ou p-ERK 1/2 normalizadas pela respectiva expressão de banda de tubulina.

Deteccção de níveis de prostaglandina PGE₂: A deteção da PGE₂ (Invitrogen) foi realizada pelo método de ELISA sandwich (Ensaio Imuno-Enzimático) no estriado lesionado de animais tratados com salina ou L-DOPA (+ anti-inflamatórios ou veículo). A deteção da prostaglandina foi realizada empregando anticorpos de captura, PGE₂ padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. A ligação antígeno-anticorpo foi detectada pelo reconhecimento espécie-específico com um anticorpo associado à peroxidase por 2h. O conjugado não ligado foi removido por lavagem com tampão (fornecido pelo kit) seguido pela incubação com o substrato cromogénico 3,3', 5,5' – tetrametilbenzidina (TMB) por 45 min. A reação colorimétrica produzida pela peroxidase na presença do TMB foi interrompida pela adição de solução de interrupção da reação. A equação da reta referente à curva padrão produzida a partir de humano recombinante foi utilizada para calcular os níveis de em cada amostra. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. A leitura das amostras foi feita em filtro de 405nm. O limite de deteção do método é de 13,4 pg/ml.

3.3) Desenho Experimental (partes 1 e 3):

- **Parte 1:**

Linha Temporal de tratamento com L-DOPA por diferentes dias: Os animais foram expostos ao teste do cilindro e posteriormente ao teste rotatório de apomorfina (0,5 mg/kg s.c.) e foram selecionados os animais que apresentaram menor uso da pata contralateral à lesão, associado a ≥ 3 rotações contralaterais/min (com exceção dos animais sham), indicando uma lesão dopaminérgica de pelo menos 40% (Iancu *et al.*, 2005). Dois dias após o Teste de Rotação Induzida por Apomorfina (tempo necessário para garantir o completo *clearance* da droga), os animais foram divididos em grupos que garantissem similar distribuição de intensidade de lesão entre os grupos, com o objetivo de caracterizar a origem da inflamação em diferentes tempos de tratamento com L-DOPA.

Logo, o tratamento dos grupos foi realizado da seguinte forma:

- Grupo sham – microinjetado com salina sem administração de drogas, sacrificado 21 dias após a lesão (n=7);
- Grupo 1 – microinjetado com 6-OHDA, sacrificado 21 dias após a lesão (n=7);
- Grupo 2 – 6-OHDA 21 dias + dose única de L-DOPA (n=7);
- Grupo 3 – 6-OHDA 21 dias + tratamento com L-DOPA por 7 dias (n=7);
- Grupo 4 – 6-OHDA 21 dias + tratamento com L-DOPA por 14 dias (n=7);
- Grupo 5 – 6-OHDA 21 dias + tratamento com L-DOPA por 21 dias (n=7);

Para garantir que os efeitos encontrados com a L-DOPA eram consequência do tratamento em si e não um efeito temporal, outro grupo foi adicionado:

- Grupo 6 - 6-OHDA 21 dias + tratamento com salina por 21 dias (n=6).

Este grupo passou pelos mesmos testes comportamentais para identificação da lesão e apresentaram níveis similares de perda dopaminérgica, validando sua participação no estudo (dados não mostrados). Com exceção dos dados de astrócitos e micróglia (demonstrados nas figuras 32 a 37), os resultados deste grupo não foram significativamente diferentes do Grupo 1 e, portanto, não foram apresentados no trabalho.

Após a última administração de L-DOPA de cada grupo (com exceção dos grupos sham, 1 e 6), os animais passaram pelo teste de pontuação de AIMs para caracterização da LID. Três horas após a administração de L-DOPA, os camundongos foram sacrificados e tiveram seus encéfalos retirados para posterior corte do encéfalo no criostato e uso na imunohistoquímica. Os animais utilizados para Western Immunoblot e ELISA foram sacrificados uma hora após a última dose de droga. O desenho experimental está esquematizado na figura 14.

Figura 14: Linha Temporal de tratamento com L-DOPA por diferentes dias. Camundongos foram lesionados unilateralmente com 6-OHDA e três semanas após a microinjeção, passaram por testes comportamentais (Teste do Cilindro e Rotação por apomorfina 0,5 mg/kg) para determinar a intensidade da lesão. Os animais foram então divididos em grupos (citados acima) e foi iniciado o tratamento com L-DOPA por diferentes dias durante 21 dias (os dias utilizados foram 1, 7 14 e 21 de tratamento). Ao longo dos 21 dias, os animais foram avaliados para análise de desenvolvimento de AIMs e sacrificados para fixação do encéfalo.

- **Parte 3:**

Tratamento dos animais com L-DOPA + anti-inflamatórios: 21 dias após a cirurgia de lesão com 6-OHDA, os animais foram expostos ao teste rotatório de apomorfina, selecionados (≥ 3 rotações contralaterais/min) e submetidos cronicamente ao tratamento com L-DOPA (25

mg/kg, i.p. + benserazida 10 mg/kg, i.p.), que consistiu em 2 injeções/dia durante 21 dias. Após o tratamento crônico com L-DOPA, foram selecionados camundongos que apresentaram níveis elevados de AIMS (critérios de inclusão: pelo menos 40% do escore máximo de AIMS globais) e divididos nos grupos experimentais descritos abaixo para a análise do efeito de drogas anti-inflamatórias na manifestação da LID. Para os experimentos de análise de LID em grupos onde houvesse reutilização do grupo experimental, isto é, um mesmo grupo de animais tratado com diferentes fármacos, um *washout* de 72h era dado (sob tratamento com L-DOPA) após cada experimento e os AIMS eram analisados antes de se iniciar um novo set de experimentos (e a análise somente com L-DOPA era usada como controle). As drogas utilizadas, seu mecanismo de ação proposto, o tempo e via de administração estão resumidos na tabela 1.

Drogas	Iniciais	Mecanismo	Dose (via)	Tempo de injeção (min)	Referência
Parte 3.1 - Canabinóides					
AM 251	AM	Antagonista CB ₁	1 mg/kg (i.p.)	-45	Campos et al., 2013
GW 9662	GW	Antagonista PPAR gamma	4 mg/kg (i.p.)	-45	Martinez et al., 2015
Capsazepina	CPZ	Antagonista TRPV-1	1 and 5 mg/kg (i.p.)	-30	-
Araquidonoil serotonina	AA-5-HT	Inibidor da AHAG/ Antagonista TRPV-1	5 mg/kg (i.p.)	-30	Maione et al., 2007
Canabidiol	CBD	Inibidor da AHAG/ Modulador alostérico de CB ₁	15, 30 and 60 mg/kg (i.p.)	-15	-
Parte 3.2 - Inibidores de COX					
Celecoxibe	CELEC	Inibidor específico de COX-2	1, 5 e 10 mg/kg (i.p.)	-30	Chen et al., 2000
Indometacina	INDO	Inibidor de COX 1/2	10 mg/kg (i.p.)	-30	Machado et al., 2010
Geral					
L-DOPA + Benserazida	L-DOPA	Precursor de dopamina + inibidor da DCAA	25 + 10 mg/kg (i.p.)	0	Pavón et al., 2006

Tabela 1: Protocolo padrão para administração de fármacos. A Tabela 1 contém os medicamentos administrados com as respectivas iniciais, o mecanismo farmacológico, a dose e a via de administração, o tempo de injeção antes do tratamento com L-DOPA e estudos prévios utilizados para seleção de dose. As doses de medicamentos sem referência foram baseadas em curvas dose-resposta. COX: ciclooxigenase; TMA: transportador de membrana de anandamida; FAAH: amida hidrolase de ácidos graxos; AADC: descarboxilase de ácidos aromáticos; CB₁: receptor canabinóides tipo 1; PPAR: Receptor ativado por proliferador de peroxissomo; TRPV: receptor vaniloide transitório.

- **Canabinóides:**

- **Canabidiol:** nosso propósito foi investigar se o CBD poderia interferir com a LID já estabelecida. Para isso, os camundongos discinéticos (após tratamento de 21 dias com L-DOPA) foram tratados com três doses diferentes de CBD (15, 30 ou 60 mg / kg, i.p., durante 3 dias cada; 15 min antes da administração de L-DOPA (Morgese *et al.*, 2007; Martinez *et al.*, 2015) e comparados ao pré-tratamento apenas com L-DOPA. Os AIMs foram avaliados imediatamente após o tratamento farmacológico no 3º dia. Grupos experimentais: Vei/L-DOPA; CBD-15/L-DOPA; CBD-30/L-DOPA e CBD-60/L-DOPA (n = 8 camundongos/grupo).

- **Capsazepina:** nosso objetivo foi investigar se os receptores de TRPV-1 poderiam estar envolvidos na modulação do CBD sobre os AIMs induzidos por L-DOPA, como sugerido em relatos anteriores de González-Aparicio e Moratalla (2014) e Morgese *et al.* (2007). Para isso, os animais foram tratados com o antagonista de TRPV-1 CPZ (1 ou 5 mg/kg, i.p.; 30 min antes da L-DOPA e 15 min antes do CBD 30 mg/kg) e comparados ao pré-tratamento apenas com L-DOPA. Grupos experimentais: Vei/L-DOPA; CBD-30/L-DOPA; CPZ-1/L-DOPA; CPZ-5/L-DOPA; CPZ-1 + CBD-30/L-DOPA e CPZ-5 + CBD-30/L-DOPA (n = 8 camundongos/grupo).

- **Araquidonoil serotonina:** nosso propósito foi investigar se o aumento da anandamida, através da inibição da enzima Amida-Hidrolase de Ácidos Graxos (FAAH - Fatty acid amide hydrolase), poderia estar envolvido na modulação de CPZ+CBD sobre os AIMs induzidos por L-DOPA. Para isso, utilizamos um inibidor concomitante da FAAH e antagonista TRPV-1, AA-5-HT (5 mg/kg i.p., 30 min antes da L-DOPA por três dias) e comparamos ao pré-tratamento apenas com L-DOPA. Grupos experimentais: Vei/L-DOPA e AA-5-HT/L-DOPA (n = 8 camundongos/grupo).

- **AM251:** nosso objetivo foi investigar a participação de receptores de canabinóides tipo 1 (CB₁) nos efeitos de CPZ+CBD sobre os AIMs induzidos por L-DOPA (Morgese *et al.*, 2007). Para isso, utilizamos o antagonista CB₁ AM251 (1 mg / kg i.p., 45 min antes da L-DOPA por três dias) e comparamos ao pré-tratamento apenas com L-DOPA. Grupos experimentais: Vei/L-DOPA; AM251/L-DOPA; CPZ-5 + CBD-30/L-DOPA e AM251 + CPZ-5 + CBD-30/L-DOPA (n = 7 camundongos/grupo).

- **GW9662:** nosso objetivo foi investigar o possível envolvimento de receptores de PPAR γ nos efeitos de CPZ+CBD sobre os AIMs induzidos por L-DOPA, como sugerido por Martinez *et al.* (2015). Para isso, utilizamos o antagonista PPAR γ GW9662 (4 mg/kg i.p., 45 min antes da L-DOPA por três dias) e comparamos ao pré-tratamento apenas com L-DOPA. Grupos experimentais: Vei/L-DOPA, GW9662/L-DOPA, CPZ-5 + CBD-30/L-DOPA e GW9662 + CPZ-5 + CBD-30/L-DOPA (n = 7 camundongos/grupo).

- **Atividade locomotora:** A atividade locomotora foi medida em um grupo independente de animais. Avaliamos os efeitos do tratamento com CPZ-5 + CBD-30/L-DOPA (n = 8) no teste de campo aberto e comparamos esse efeito com aqueles induzidos por Vei/L-DOPA (n = 8) ou 6-OHDA apenas (n = 8). O mesmo esquema de tratamento de drogas descrito anteriormente foi empregado. Os animais foram submetidos ao teste de campo aberto 3h após a última injeção de L-DOPA. Grupos experimentais: 6-OHDA (lesão); Vei/L-DOPA e CBD+CPZ/L-DOPA (n = 8 camundongos/grupo). O desenho experimental está esquematizado na figura 15.

Figura 15: Linha temporal de tratamento com canabinóides. Após o estabelecimento da LID por 21 dias, os fármacos canabinóides (ou veículo) foram administrados durante três dias após a divisão dos animais nos grupos experimentais. Para os experimentos de análise de LID, um *washout* de 72h foi dado (sob tratamento com L-DOPA) após cada experimento e os AIMs eram analisados antes de se iniciar um novo set de experimentos (e a análise somente com L-DOPA era usada como controle). O teste de campo aberto foi realizado em um grupo independente de animais tratados com L-DOPA por 21 dias e depois expostos a CPZ+CBD por três dias adicionais (utilizando como controle animais apenas lesionados com 6-OHDA). Para a análise molecular, os animais passaram pelo mesmo protocolo do campo aberto e foram sacrificados 3h após a administração de L-DOPA. Os encéfalos dissecados para imunohistoquímica e Western Imunoblot foram utilizados.

- **Inibidores de Ciclooxygenase:**

- **Celecoxibe:** nosso propósito foi investigar se o Celec poderia reduzir a LID já estabelecida. Para isso, camundongos lesionados com 6-OHDA e tratados previamente com L-DOPA por

21 dias foram tratados com três doses diferentes de Celec (1, 5 ou 10 mg/kg, i.p., durante 5 dias cada; 30 min antes da administração de L-DOPA; Chen *et al.*, 2000) e comparados a animais que receberam salina 30 min antes da L-DOPA (Vei/L-DOPA). Os AIMS foram avaliados imediatamente após o tratamento com L-DOPA no 1º, 3º e 5º dia. Os grupos experimentais foram: Vei/L-DOPA; Celec-1/L-DOPA; Celec-5/L-DOPA e Celec-10/L-DOPA (n = 8 camundongos/grupo).

- **Indometacina:** nosso objetivo foi investigar se a Indo poderia interferir na LID. Para tal, camundongos lesionados com 6-OHDA e tratados previamente com L-DOPA por 21 dias foram tratados com uma dose de Indo descrita como capaz de inibir COX-1 e COX-2 (10 mg/kg, i.p., durante 5 dias cada; 30 min antes da administração de L-DOPA; Machado *et al.*, 2010) e comparados ao pré-tratamento (no 21º dia, apenas com L-DOPA). Os AIMS foram avaliados imediatamente após o tratamento com L-DOPA no 1º e 3º dias. Não houve análise no 5º dia devido à perda de 50% dos animais pós-tratamento. Grupos experimentais: Vei/L-DOPA; Indo/L-DOPA (n = 6 camundongos/grupo). O desenho experimental está esquematizado na figura 16.

Figura 16: Linha temporal de tratamento com inibidores de COX. O Celec (1, 5 ou 10 mg/kg, i.p.; ou veículo) foi administrado durante cinco dias após o estabelecimento da LID por 21 dias. A análise de AIMS foi realizada nos dias 1, 3 e 5 de tratamento. Para a Indo (10 mg/kg, i.p.), o tratamento apenas com L-DOPA (vigésimo primeiro dia) foi utilizado como controle antes do tratamento de 3 dias com o inibidor. O quinto dia não foi analisado devido à perda de 50% dos animais. Para a análise molecular, diferentes animais passaram pelo mesmo protocolo de análise de AIMS e foram sacrificados 3h após a administração de L-DOPA e tiveram o encéfalo dissecado para imunohistoquímica.

3.4) Estudos *In Vitro* – Materiais e Métodos (Parte 2 e Resultados

Complementares):

Procedimentos de preparação e cultivo de células gliais: O procedimento de preparação foi realizado como descrito por Sepulveda-Diaz *et al.* (2016). Resumidamente, as

soluções de preparação consistem de 1 mg/ml de polietilenoimina diluído num tampão de borato de pH 8,3 para micróglia (Michel *et al.*, 1997, Rousseau *et al.*, 2013) e 1,1 mg de laminina por poço diluído em PBS para astrócitos. Estas soluções são aplicadas em frascos para cultura durante 1-2 h a 37°C, depois lavadas 4 vezes com PBS antes da aplicação do meio de cultura contendo as células dissociadas dos encéfalos de camundongos. Para placas de 48 poços e frascos de cultura T-75, usamos 0,3 e 10 ml de solução de revestimento, respectivamente.

O isolamento de células microgliais e seu cultivo também foram realizados com base no protocolo de Sepulveda-Diaz *et al.* (2016). Para produzir células microgliais em grandes quantidades, o equivalente a dois encéfalos de camundongo foi posto em frascos Corning T-75 revestidos com polietilenoimina ou laminina (Sigma-Aldrich) contendo 12 ml de meio completo (mistura de nutrientes DMEM suplementado com soro fetal bovino – FBS - a 10% e antibióticos). Dez mililitros de meio de cultura eram removidos 48 h após o plaqueamento para eliminar detritos flutuantes e 12 ml de meio completo fresco era adicionado em seguida. Nenhuma alteração de meio adicional foi feita até o desaparecimento total de astrócitos (para culturas purificadas de micróglia; 18 a 21 dias) ou de micróglia (para culturas purificadas de astrócitos; 10 a 14 dias). Se as culturas fossem mantidas por períodos de tempo mais longos antes do processamento, eram adicionados 2 ml de meio completo a frascos de cultura. A incubação foi realizada a 37°C em atmosfera umidificada de 95% de oxigênio e 5% de CO₂. Após o período de isolamento, as células microgliais foram semeadas em placas Nunc 48 não revestidas com qualquer tipo de reagente (adicionadas diretamente ao plástico) e os astrócitos revestidos previamente com laminina (40 min.) com a densidade de 100 000 células por poço durante 24h utilizando o meio N5B contendo glicina 100 µM.

Estimulação celular: As células gliais foram tratadas com LPS (10 ng/ml), L-DOPA (3 e 10 µM), DA (3 e 10 µM), glutamato (Glu; 50 e 500 µM), α -sin em sua forma fibrilar (α -sin; 5 µM, a não ser quando especificado na seção de resultados), agonista do receptor *Toll-like receptor 2* (TLR2), PAM (1 µg/ml) ou agonista do receptor purinérgico P2X7, BzATP (500 µM) durante 24h para estudar a resposta de liberação de glutamato e/ou liberação de citocinas.

Os compostos suscetíveis a interferir com o processo de liberação de fatores inflamatórios e/ou glutamato, como o antagonista P2X7, JNJ (20 µM), o antagonista de TLR2 (anti-TLR2; 2,5 µg/ml), o inibidor de p-AKT, LY294002 (2,5 µM), inibidores de NADPH

oxidase apocinina (APO; 300 μ M) e DPI (1 μ M), o análogo solúvel em água da vitamina E, Trolox (TROL; 10 μ M), o inibidor do transportador xCT, sulfasalazina (Sulfa, 50 μ M; Mesci *et al.*, 2015), agonistas D1R e D2R, SKF 81297 (SKF) e 2-Bromocriptina (2-Br), respectivamente (10 μ M) e o ativador direto da adenilil ciclase forskolina (FK; 10 μ M) foram adicionados 2 h antes de iniciar a estimulação com α -sin_f e deixados em seguida em contato com as células por mais 24h (Sepulveda-Diaz *et al.*, 2016). Em casos onde não houve estimulação com α -sin_f, os reagentes eram mantidos por 24h em contato com as células. Considerando que a DA é facilmente oxidável, o meio dos poços sob este tratamento foi mudado em intervalos regulares para evitar a associação dos dados à forma oxidada do neurotransmissor.

Determinação da produção de citocinas produzidas por células gliais: A detecção das citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6 [R&D systems]) foi realizada pelo método de ELISA sandwich (Ensaio Imuno-Enzimático) no meio de cultura coletado após exposição das células a fatores inflamatórios e/ou protetores. O processo foi similar ao adotado para a detecção de prostaglandinas estriado lesionado (ver página 73).

Ensaio de glutamato: O meio de cultura contendo o glutamato produzido e liberado durante as 24h após o tratamento com os fármacos especificados (10⁶ células/poço) foi separado em tubos individuais e depois medido com o Kit Amplex Red Glutamic Acid/Glutamate Oxidase Assay (Invitrogen) após o período de 30 min de reação.

Imunofluorescência: Após o término dos tratamentos, as culturas foram fixadas com paraformaldeído a 4% (20 min, temperatura ambiente), lavadas com PBS e incubadas com os seguintes anticorpos: CD11b (1: 100 em PBS durante 72h), Iba-1 (1: 500 em PBS-Triton 0,2% durante 24h), α -sin (1: 500 em PBS-triton 0,05% durante 24h), xCT (1: 200 em PBS-triton 0,05% durante 24h) e p47-PHOX (NOX2; 1:50 em PBS-triton 0,05% durante 24h). Quando realizada a dupla marcação de Iba-1/CD11b, a detecção de CD11b foi realizada antes da de Iba-1. Como anticorpos secundários, utilizaremos um Alexa Fluor 555 de cabra anti-rato ou Alexa Fluor 488 de burro anti-coelho (Invitrogen). Os núcleos de células microgliais foram marcados com DAPI (1 mg/ml por 2min). O contraste de fases e as imagens fluorescentes foram obtidos utilizando um microscópio invertido Nikon TE 2000 (Nikon, Tóquio, Japão) equipado com uma câmara digital ORCA-ER e o software de imagem de imagem HC.

Western Immunoblot: As células gliais foram semeadas em placas de 48 poços e tratadas com os fármacos especificados conforme protocolo descrito anteriormente (ver seção “Estimulação celular”). Após 30 min (para p-AKT) ou 24h (para Iba-1, GFAP, AKT total, ou GADPH) de estimulação com as drogas, as células foram removidas e as frações subcelulares foram obtidas adaptando o protocolo descrito anteriormente (Santa-Cecília *et al.*, 2016). As células foram lisadas com tampão M-PER (Invitrogen) contendo inibidor de protease e fosfatase (Invitrogen). Uma vez que as amostras foram recuperadas e transferidas para tubos, os seus conteúdos de proteína foram quantificados utilizando o Espectrofotômetro Nanodrop 8000. Quantidades iguais de proteína (aprox. 10 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram incubadas com anticorpo primário contra p-AKT (1: 1000, Cell Signalling), AKT (1: 1000, Cell Signaling), Iba-1 (1:500, Wako), GFAP (1:1000, Dako) e GADPH (1: 2000, Sigma-Aldrich). Após incubação, as membranas foram lavadas com tampão tris salina + 0,1% tween20 (TBS-T) e incubadas novamente com anticorpo secundário de coelho (Odyssey). As bandas foram visualizadas usando um scanner LiCor Odyssey e quantificadas com o software IMAGEJ (dos-Santos-Pereira *et al.*, 2015). As Unidades Arbitrárias (U.A.) utilizadas como dados de densitometria representam a análise de pixel a partir das intensidades de banda de proteína divididas pelas suas respectivas intensidades totais de controle (GADPH).

Captação de [14C]-cistina: A atividade de captação foi medida com base no protocolo de Tomi *et al.* (2002). 10⁶ células foram plaqueadas numa placa Nunc de 48 poços durante 24h e depois tratadas com α -sin ou drogas especificadas durante mais 24h. No final do período, foram adicionados 50 µl de meio contendo cistina radiomarcada nos poços (concentração final de 8 µM) e incubados a 37°C durante 30 min na presença ou ausência de inibidores (DA, FK e LY por 2 h). A captação foi terminada por três vezes de lavagem com PBS. Depois de lisar as células com água tridestilada estéril gelada, a radioatividade foi medida através de um contador de cintilação líquida.

Quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelulares: As espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) foram avaliadas utilizando o reagente CellROX Deep Red Reagent permeável à membrana, conforme descrito anteriormente (Sepulveda-Diaz *et al.*, 2016). Resumidamente, culturas de células microgлияis previamente expostas a CellROX (10 µM) por 30 min foram lavadas e fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS. A quantificação intracelular de ROS foi então feita utilizando microscopia de

fluorescência invertida. Para cada condição de cultura, imagens fluorescentes de 10 campos escolhidos aleatoriamente foram adquiridas com parâmetros de aquisição idênticos usando uma objetiva de fluorescência 20x. Os resultados foram expressos em porcentagem de intensidade comparada ao controle.

Detecção de excitotoxicidade por liberação de lactato desidrogenase: A citotoxicidade foi determinada usando o Kit de Detecção de Citotoxicidade (Roche) seguindo instruções do fabricante. O ensaio baseia-se na medição da atividade da lactato desidrogenase (LDH) liberada para o meio de cultura após a permeabilização ou o rompimento da membrana celular. A porcentagem de citotoxicidade se refere à quantidade de LDH liberada das células em comparação a células não tratadas.

Análise estatística (partes 1, 2 e 3): A análise estatística foi realizada utilizando o software SPSS para Windows (versão 20). Os dados foram analisados utilizando o Student teste t para a análise de dois grupos, ANOVA univariada ou multivariada (seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni) para três grupos ou mais, ou através de análises não paramétricas, no caso de análise de LID (Friedman seguido de Wilcoxon ou Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, de acordo com o experimento). O valor considerado significativo foi de $p < 0,05$. A análise estatística feita para o experimento correspondente está descrita na legenda da figura. Os dados estão representados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) para dados paramétricos ou valores individuais e mediana para dados não-paramétricos.

RESULTADOS

**CAPÍTULO 1 – CURVA TEMPORAL DA DISCINESIA INDUZIDA POR
L-DOPA E ANÁLISE DE FATORES INFLAMATÓRIOS.**

4. RESULTADOS

O tratamento crônico com L-DOPA induz o surgimento de AIMs em camundongos hemiparkinsonianos: Nosso primeiro objetivo foi caracterizar o surgimento da LID ao longo do tratamento com L-DOPA e, concomitantemente, determinar a presença de fatores inflamatórios que poderiam contribuir para o desenvolvimento desta patologia. Para verificar se os animais microinjetados com 6-OHDA apresentaram intensidades similares de perda dopaminérgica estriatal, utilizamos dois testes comportamentais que funcionam como indicadores da perda de DA no estriado, o teste do cilindro e a rotação induzida por apomorfina (Iancu *et al.*, 2005).

Ao analisarmos o teste do cilindro, observamos que todos os grupos experimentais apresentaram índices similares de uso da pata anterior contralateral à lesão (tratamento: $F(5, 36) = 5,849$, $p < 0,05$) – reduzidos em comparação ao lado ipsilateral (lado: $F(1, 36) = 55,93$, $p < 0,05$; interação: $F(5, 36) = 3,798$, $p < 0,05$), indicando comprometimento motor derivado da lesão. O teste de rotação induzida por apomorfina, por sua vez, apontou que os animais apresentaram níveis de rotação contralateral ao lado lesionado de no mínimo 3 rotações por minuto ($F(5, 36) = 4,048$, $p < 0,05$) (Material Suplementar 1; Iancu *et al.*, 2005). Portanto, os grupos selecionados para os tratamentos apresentaram níveis similares de rotação contralateral e uso reduzido da pata contralateral, indicando uma perda de DA (de no mínimo 40%) similar entre todos os grupos (com exceção do grupo sham). Tendo em vista estes dados, iniciamos o tratamento com L-DOPA nos grupos selecionados.

O tratamento com L-DOPA resultou no desenvolvimento tempo-dependente de AIMs do tipo axial, do membro anterior e orofacial, como esperado ($X^2(5) = 27,66$; $p < 0,05$; figura 17A). Enquanto os grupos com 1 e 7 dias de tratamento não foram significativamente diferentes dos grupos não tratados com L-DOPA ($p > 0,05$ vs. sham), os grupos de 14 e 21 dias tiveram um aumento significativo na manifestação da LID ($p < 0,05$ vs. sham). O tratamento com L-DOPA também induziu um aumento geral da manifestação dos AIMs locomotores a partir do primeiro dia ($X^2(5) = 13,13$, $p < 0,05$; figura 17B); entretanto, nenhum dos dias de tratamento com L-DOPA alcançou nível de significância para serem diferentes do grupo controle, apesar de existir tendência (dias 1, 7, 14 e 21: $p < 0,1$ vs. sham). O grupo lesionado com 6-OHDA sem tratamento com L-DOPA não apresentou desenvolvimento de AIMs. É interessante notar que, apesar de a LID se mostrar

significativamente maior a partir do décimo quarto dia, alguns animais presentes nos grupos tratados com L-DOPA apresentaram LID desde o primeiro dia de tratamento.

Figura 17: Análise da curva temporal do tratamento com L-DOPA na manifestação de AIMs. (A) Somatório das discinesias orofacial, de membro anterior e distonia axial ao longo do tratamento com L-DOPA. A manifestação de AIMs se tornou significativa somente a partir do décimo quarto dia de tratamento, alcançando seu pico no vigésimo primeiro dia. (B) Somatório da discinesia de locomoção circular contralateral à lesão ao longo do tratamento. Diferentemente da LID axial, do membro anterior e orofacial, a LID locomotora apareceu desde o primeiro dia de L-DOPA e se manteve constante durante todo o tratamento. * $p < 0,05$ vs. sham (Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (traço).

O tratamento com L-DOPA não influencia a expressão de TH no estriado lesionado: Em seguida, realizamos a técnica de imunohistoquímica para a enzima TH, com o objetivo de caracterizar a lesão estriatal em camundongos, analisar a intensidade da lesão nos animais e verificar se o tratamento com L-DOPA por diferentes dias seria capaz de alterar a lesão causada pela 6-OHDA.

Foi possível observar que na região rostral, a área dorsomedial não apresentou alteração da expressão de TH, indicando ausência de lesão dopaminérgica ($F(5, 36) = 2,103$, $p < 0,05$; figura 18A), mas houve uma diminuição intensa na marcação de fibras na área dorsolateral ($F(5, 36) = 15,51$, $p < 0,05$; figura 18B) e ventral ($F(5, 36) = 3,939$, $p < 0,05$; figura 18D) em comparação aos animais sham, indicando lesão intensa nessas áreas. Os diferentes tempos de tratamento com L-DOPA não alteraram o padrão de lesão causado pela 6-OHDA em nenhuma das áreas analisadas (6-OHDA: $p < 0,05$ vs. sham; L-DOPA 1, 7, 14 e 21 dias: $p > 0,05$ vs. 6-OHDA).

O NAc, região rica em DA, mas pouco relacionada a controle motor (Nicola, 2007), foi utilizado como controle positivo. Nessa região, não houve perda de marcação para a

enzima TH ($F(5, 36) = 0,6981$, $p > 0,05$; figura 18C), e, assim como o estriado, não sofreu efeito do tratamento com L-DOPA.

Figura 18: Expressão da enzima TH na região rostral do estriado. (A) Na área dorsomedial do estriado rostral, não houve uma redução significativa na expressão de TH em relação aos animais sham. (B) Na área dorsolateral, houve perda dopaminérgica de 50% em relação ao grupo sham; o tratamento temporal com L-DOPA não afetou a marcação dopaminérgica. (C) O Núcleo Acumbens não apresentou perda de fibras TH+. (D) O padrão de perda da área dorsolateral também é encontrado na área ventrolateral. Bregma: +0,86mm. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni, $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Nas secções mediais, a área dorsomedial passou a apresentar uma redução na expressão de TH ($F(5, 36) = 7,944$, $p < 0,05$; figura 19A). A área dorsolateral continuou a apresentar uma redução intensa de fibras dopaminérgicas, como esperado ($F(5, 36) = 25,01$, $p < 0,05$; figura 19B), assim como a área ventromedial ($F(5, 36) = 35,03$, $p < 0,05$; figura 19C) e ventrolateral ($F(5, 36) = 19,83$, $p < 0,05$; figura 19D). Como na região rostral, o tratamento com L-DOPA ao longo do tempo não modificou a lesão causada pela 6-OHDA (dias 1 a 21 de L-DOPA: $p > 0,05$ vs. 6-OHDA).

Figura 19: Expressão de TH na região medial do estriado. (A) No estriado medial, houve uma redução significativa na expressão de TH na área dorsomedial. (B) Na área dorsolateral, a perda dopaminérgica foi ainda mais intensa. (C) A área ventromedial apresentou perda intensa de marcação de TH de modo similar à área dorsomedial. (D) A perda dopaminérgica também é encontrada na área ventrolateral em grande intensidade; como esperado, o tratamento temporal com L-DOPA não afetou a expressão de TH. Bregma: +0,02mm. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni, $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Com relação à região caudal, é possível observar um efeito geral intenso da lesão tanto na área dorsolateral ($F(5, 36) = 661,7$, $p < 0,05$; figura 20A) quanto na área ventrolateral ($F(5, 36) = 144,6$, $p < 0,05$; figura 20B). Mais uma vez, o tratamento com L-DOPA não foi efetivo em modificar a lesão causada pela 6-OHDA em nenhuma das duas áreas (dias 1 a 21 de L-DOPA: $p > 0,05$ vs. 6-OHDA). As imagens representativas do padrão de perda dopaminérgica causada pela 6-OHDA estão demonstradas na figura 21. O tratamento por 21 dias de salina não foi significativamente diferente dos animais tratados com L-DOPA em nenhuma das regiões ou áreas analisadas ($p > 0,05$ vs. L-DOPA 21 dias; dados não mostrados).

Figura 20: Expressão de TH na região caudal do estriado. (A) Na área dorsolateral, a perda dopaminérgica é quase total, sem qualquer diferença após os dias de tratamento com L-DOPA. (B) O padrão se repete na área ventrolateral, com uma perda de fibras dopaminérgicas próxima de 100%. Bregma: -0,58mm. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni, $n = 7/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O surgimento da LID está diretamente relacionado à cronicidade do tratamento com L-DOPA: Com o objetivo de avaliar se o tempo de tratamento com L-DOPA influencia a correlação existente entre a ausência de fibras dopaminérgicas estriatais e a manifestação da LID, anteriormente discutida por Francardo *et al.* (2014), foi realizado um gráfico de correlação para cada ponto da curva temporal (Figura 22A – 22E).

Conforme observado nas correlações apresentadas (figuras 22A-22D), existe uma correlação direta entre a intensidade de lesão dopaminérgica e a manifestação da LID que aumenta conforme o tempo de tratamento com L-DOPA. Quando a análise é realizada isoladamente nos diferentes dias da curva temporal, conseguimos observar que, à medida que o tempo de administração da droga aumenta, existe também um aumento da correlação positiva entre a manifestação de AIMs e a intensidade da lesão, tendo sua maior correlação no ponto de 21 dias de tratamento. Isso nos indica que o tempo de tratamento com L-DOPA é um fator importante para o surgimento da LID, sugerindo que um efeito plástico estriatal se faz necessário para a manifestação da LID.

Figura 21: Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo em diferentes posições relativas ao Bregma ilustrando a perda de fibras TH+ no estriado. (A-A'') Imagens da marcação de fibras dopaminérgicas ao longo do estriado de um animal microinjetado com salina ou (B-B'') microinjetado com 6-OHDA, tratado ou não com L-DOPA. Ao longo de toda extensão rostro-caudal do estriado, é possível observar uma perda parcial de fibras, menos intensa na região rostral e aumentando até a região caudal do estriado. (i-x) Em maior aumento, se torna evidente a perda dopaminérgica preferencial na região dorsolateral do estriado lesionado.

Lesão x discinesia

Figura 22: Correlação entre a intensidade da lesão e os níveis de LID. (A) A correlação somente no grupo tratado 1 dia com L-DOPA aponta uma correlação fraca entre a lesão dopaminérgica e a manifestação de AIMs. (B) O grupo com 7 dias de L-DOPA ainda apresenta uma correlação fraca entre os dois fatores. (C) A partir do décimo quarto dia de tratamento, a correlação passa a se tornar significativa. (D) O vigésimo primeiro dia de tratamento possui o maior coeficiente de correlação entre os grupos. Correlação de Spearman ($n = 7/\text{grupo}$). Dados apresentados em forma de valores individuais.

O surgimento da LID é acompanhado pelo aumento na expressão de FosB/ Δ FosB no estriado lateral lesionado de camundongos: Além da estimulação dos receptores de DA, a LID é acompanhada por uma série de eventos moleculares dentro dos núcleos da base, como o aumento nos níveis de genes de resposta imediata, como FosB/ Δ FosB e p-Ach3 (Andersson *et al.* 1999; Cenci *et al.* 1999; Darmopil *et al.*, 2009; Padovan-Neto *et al.*, 2013; Ruiz-DeDiego *et al.*, 2015b; Solís *et al.*, 2015). Para melhor caracterizar o surgimento dos AIMs induzidos por L-DOPA, analisamos o surgimento de FosB em camundongos discinéticos avaliando se o aparecimento deste gene precedia ou sucedia a manifestação da LID.

Nas áreas dorsolateral e ventrolateral do estriado lesionado, o tratamento com L-DOPA levou a um aumento significativo na expressão de FosB em todas as secções estriatais

avaliadas (rostral: $F(5, 78) = 86,04$, $p < 0,05$; figura 23A; medial: $F(5, 78) = 111,1$, $p < 0,05$; figura 23B; caudal: $F(5, 78) = 68,96$, $p < 0,05$; figura 23C). Nas áreas dorsomedial e ventromedial, a expressão de FosB não foi alterada pelo tratamento com L-DOPA ou pela lesão (rostral: $F(5, 36) = 20,63$, $p > 0,05$; medial: $F(5, 78) = 55,81$, $p > 0,05$; caudal: não se aplica. Dados não mostrados). O tratamento com L-DOPA aumentou a expressão de FosB no estriado lesionado a partir do primeiro dia de tratamento nas regiões medial e caudal, mantendo uma alta expressão ao longo dos 21 dias (dias 1, 7, 14 e 21: $p < 0,05$ vs. sham). Na região rostral, esse aumento pôde ser visto somente a partir do sétimo dia (dias 7, 14 e 21: $p < 0,05$ vs. sham). O tratamento com salina por 21 dias não induziu aumento de FosB em comparação aos animais sham ou somente 6-OHDA em nenhuma das regiões ou áreas analisadas ($p > 0,05$ vs. sham; dados não mostrados), indicando a necessidade do tratamento com L-DOPA para indução deste protooncogene.

A figura 25 demonstra a localização de FosB no estriado lesionado, correlacionando-a com a perda de TH e surgimento de COX-2.

Figura 23: Quantificação de células FosB+ na área lateral do estriado lesionado após tratamento com L-DOPA. (A) Na região rostral do estriado, há um aumento modesto, porém, significativo de FosB a partir do sétimo dia de tratamento. (B) Na região medial, o aumento de FosB se dá desde o primeiro dia, alcançando seu pico de expressão no vigésimo primeiro dia. (C) Na região caudal, a expressão de FosB é similar à região medial, aumentando no primeiro dia e alcançando seu pico no vigésimo primeiro dia. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni, $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento crônico com L-DOPA induz o surgimento de células COX-2+ no estriado lesionado de camundongos hemiparkinsonianos: Dados do grupo (Bortolanza *et al.*, 2015b) mostraram que o tratamento crônico com L-DOPA leva ao aumento da expressão da enzima COX-2 no estriado lesionado de ratos; entretanto, esse aumento da expressão ainda não foi completamente elucidado. Portanto, decidimos caracterizar o surgimento de COX-2 em camundongos discinéticos avaliando a partir de que ponto da curva temporal começa a ocorrer a expressão de COX-2 resultante do tratamento com L-DOPA.

Foi observado que, assim como em ratos, o surgimento da COX-2 é limitado ao lado lesionado nas três regiões estriatais - rostral, medial e caudal - de camundongos, com o grupo controle (sham) tendo expressão próxima a zero, tanto na área dorsolateral quanto ventrolateral. Nas áreas mediais do estriado, onde a perda dopaminérgica é menor, a expressão de COX-2 não foi observada (dados não mostrados).

Todas as secções estriatais avaliadas tiveram expressão significativa de COX-2 na área dorsolateral (rostral: $F(5, 36) = 2,968$, $p < 0,05$; figura 24A; medial: $F(5, 36) = 10,11$, $p < 0,05$; figura 24C; caudal: $F(5, 36) = 12,00$, $p < 0,05$; figura 24E), enquanto na área ventrolateral, o aumento significativo da expressão desta enzima ficou restrito às regiões com maior perda de TH, medial e caudal (rostral: $F(5, 36) = 1,407$, $p > 0,05$; figura 24B; medial: $F(5, 36) = 3,889$, $p < 0,05$, figura 24D; caudal: $F(5, 35) = 2,931$, $p < 0,05$; figura 24F).

O tratamento com L-DOPA aumentou a expressão de COX-2 no estriado lesionado a partir do sétimo dia de tratamento, mantendo uma alta expressão ao longo dos 21 dias na área dorsolateral tanto da região medial quanto da região caudal (dias 7, 14 e 21: $p < 0,05$ vs. sham). Na região rostral, entretanto, houve apenas uma tendência significativa ao aparecimento de células COX-2 no estriado dorsolateral lesionado a partir do sétimo dia de L-DOPA (dias 7, 14 e 21: $p > 0,05$ vs. sham).

Na área ventrolateral do estriado, o aumento de COX-2 ficou restrito somente ao vigésimo-primeiro dia de L-DOPA nas regiões medial e caudal (dia 21: $p < 0,05$ vs. sham), enquanto no estriado rostral não houve qualquer alteração significativa (dia 21: $p > 0,05$ vs. sham). O tratamento por 21 dias com salina não foi significativamente diferente dos animais sham ou somente 6-OHDA em nenhuma das regiões ou áreas analisadas ($p > 0,05$ vs. sham; dados não mostrados). A figura 25 demonstra a localização de COX-2 no estriado, correlacionando-a com a perda de TH e surgimento de FosB.

Figura 24: Quantificação de células COX-2+ no estriado lesionado após tratamento com L-DOPA. (A) Na região rostral do estriado existe uma expressão modesta e não significativa de células COX-2+, especificamente na parte dorsolateral. Apesar de haver tendência a aumentar após sete dias de tratamento com L-DOPA, esse aumento não é significativo. (B) Na parte ventrolateral, o número de células marcadas para COX-2 se mantém próximo a zero. (C) Na região medial existe um aumento significativo na expressão de COX-2 a partir do sétimo dia de tratamento com L-DOPA, se mantendo elevado até o vigésimo primeiro dia na parte dorsolateral. (D) Na área ventrolateral do estriado medial, esse aumento se restringe ao vigésimo primeiro dia. (E) Na região caudal, área dorsolateral, o padrão se repete, com aumento de COX-2 no sétimo dia, alcançando seu pico no vigésimo primeiro dia. (F) Na área ventrolateral do estriado caudal, esse aumento só existe no vigésimo primeiro dia. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni, $n = 7/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. ND: Não-detectável.

Figura 25: Fotomicrografias representativas das imunomarcações para TH, FOSB e COX-2 em camundongos tratados com L-DOPA (21 dias). (A) A marcação para a enzima TH demonstra um quadro de lesão parcial, com maior intensidade de perda dopaminérgica na área lateral das regiões medial (A') e caudal (A''). (B) Foi observada a presença da proteína FosB em todas as regiões estriatais de animais discinéticos, com um aumento de sua expressão nas regiões onde há depleção dopaminérgica. (C) Assim como o FosB, a enzima COX-2 passou a ser produzida em maior quantidade após o tratamento com L-DOPA e também só apresentou marcação nas regiões onde não havia imunoreatividade para TH.

A expressão de COX-2 é restrita à região sem presença de fibras dopaminérgicas no estriado: Para confirmar a existência de COX-2 somente na área dorsolateral do estriado, envolvida no controle motor (Ena *et al.*, 2011) e onde há maior perda de fibras dopaminérgicas, realizamos uma dupla marcação de TH e COX-2 através da técnica de imunohistoquímica.

A expressão da enzima COX-2 no estriado lesionado de camundongos é restrita à área do estriado onde não houve marcação para a enzima TH, indicando que seu surgimento ocorre somente onde há lesão dopaminérgica (figura 26). Regiões sem lesão (ou seja, com marcação intensa para TH) não apresentaram células COX-2-positivas. Logo, as áreas mediais do estriado (dorsomedial e ventromedial) onde a lesão dopaminérgica é menor, assim como o

NAC, apresentaram expressão nula de COX-2 (não demonstrado). É importante citar que, apesar de não haver surgimento significativo nas regiões mediais ou no estriado rostral, animais com perda dopaminérgica total apresentaram expressão de FosB e COX-2 nessas regiões, indicando o surgimento destas proteínas de modo generalizado em regiões com completa depleção de DA.

Figura 26: Fotomicrografias representativas da colocalização entre a enzima TH e a enzima COX-2. (A e C) No lado não lesionado, existe uma intensa marcação para TH e nenhuma célula COX-2+ existente. (B e D) No estriado lesionado, a expressão da COX-2 decorrente do tratamento com L-DOPA ocorre somente onde não há a presença de fibras dopaminérgicas. Em um maior aumento (D), é possível observar que a presença de COX-2 é estritamente limitada à área dorsolateral do estriado lesionado.

A manifestação da LID está diretamente relacionada ao surgimento de COX-2 no estriado lesionado: Considerando a restrição da expressão da COX-2 à área envolvida com o controle motor e LID, novamente foi feita uma correlação, desta vez entre a manifestação da LID e a expressão da enzima pró-inflamatória (figura 27).

Em animais tratados somente um ou sete dias com L-DOPA (figura 27A e 27B, respectivamente) existe uma correlação positiva pequena e não significativa entre os dois fatores. Entretanto, a partir do décimo quarto dia, existe uma correlação positiva intensa e significativa entre a manifestação dos AIMs e a expressão da enzima pró-inflamatória, se mantendo no vigésimo primeiro dia (figura 27C e 27D, respectivamente). Este dado sugere que o aumento da LID pode causar/ser influenciado pelo aumento da COX-2, correlação extremamente dependente do tempo de tratamento com L-DOPA.

COX-2 x Discinesia

Figura 27: Correlação entre a manifestação da LID e o número de células COX-2+ na área dorsolateral do estriado lesionado. (A) Existe uma correlação não significativa entre os fatores após o tratamento com 1 dia de L-DOPA. (B) No sétimo dia de tratamento, observamos que a correlação entre os AIMs e o número de células COX-2+ torna-se maior, ainda que não significativa. (C) A correlação se torna intensa a partir do décimo quarto dia de tratamento, onde também existe um aumento significativo da manifestação da LID (figura 17). (D) O vigésimo primeiro dia de tratamento possui o mais alto coeficiente de correlação dentre os pontos de tratamento com L-DOPA. Correlação de Spearman, $n = 7$ /grupo. Dados apresentados em forma de valores individuais.

As células COX-2 produzidas após o tratamento com L-DOPA colocalizam com neurônios no estriado lesionado: Recentemente nosso grupo descreveu que a COX-2 sintetizada no estriado lesionado de ratos tratados com L-DOPA provém de neurônios estriatais positivos para DARPP-32, indicando que a síntese desta enzima se dá preferencialmente por neurônios, em vez de células gliais (Bortolanza *et al.*, 2015b). No próximo passo foi de confirmar se esta produção neuronal seria reproduzida em um modelo de camundongos (figura 28).

A imunorreatividade positiva para COX-2 não se sobrepôs a astrócitos marcados com GFAP (figura 28A) ou micróglia marcada com Iba-1 (figura 28B). Entretanto, uma marcação positiva para COX-2 colocalizada com imunorreatividade para NeuN (figura 28C), um antígeno de proteína nuclear neuronal de 46/48 kD amplamente utilizado para identificar

neurônios, foi encontrada. Esses resultados confirmam os dados encontrados por nosso grupo, onde a proteína COX-2 foi encontrada nos neurônios do estriado lesionado. Esta colocalização ocorreu na área dorsolateral do estriado, onde há redução da marcação positiva à tirosina hidroxilase e somente após o tratamento com L-DOPA. A imunohistoquímica colorimétrica que colocaliza NeuN e COX-2 está apresentada no Material Suplementar 2.

Figura 28: Colocalização de COX-2 estriatal com neurônios (NeuN), astrócitos (GFAP) ou células microgliais (Iba-1) no estriado lesionado de camundongos tratados cronicamente com L-DOPA. (A) Fotomicrografias representando a marcação para GFAP (vermelho), (B) Iba-1 (vermelho) e (C) NeuN (vermelho) juntamente à COX-2 (verde) no estriado lesionado. A colocalização com COX-2 foi observada para NeuN (C), indicada em maior aumento, mas foi ausente para GFAP (B) e Iba-1 (C). (D) O esquema demonstra a área dorsolateral, utilizada para microfotografias do estriado lesionado. Os traços curvados apontam a marcação para COX-2. As setas fechadas apontam a presença dos tipos celulares sem colocalização; as setas abertas indicam células com colocalização. Aumento: 20x.

Os níveis de PGE₂ são elevados no estriado dorsolateral lesionado de camundongos tratados cronicamente com L-DOPA: Uma vez que o tratamento crônico com L-DOPA induziu o surgimento de COX-2 no estriado dorsolateral lesionado, verificamos em seguida se este fenômeno seria acompanhado pelo aumento dos níveis de um dos principais metabólitos ativos da enzima, a PGE₂, nesta área do estriado lesionado.

Houve um efeito geral significativo sobre a produção de PGE₂ ($F(2, 15) = 19,65$, $p < 0,05$; figura 29). Enquanto a lesão com 6-OHDA não gerou nenhuma alteração significativa

sobre a produção de PGE₂ ($p > 0,05$ vs. Sham), o tratamento com L-DOPA por 21 dias aumentou significativamente os níveis de PGE₂ ($p < 0,05$ vs. Sham).

Figura 29: Produção de PGE₂ no estriado lesionado após o tratamento com L-DOPA. O tratamento de 21 dias com L-DOPA aumentou significativamente a produção de PGE₂ em comparação aos animais sham ou lesionados com 6-OHDA. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni; $n = 6/\text{grupo}$). Valores (pg/ml) apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento crônico com L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos aumenta a expressão de NF- κ B no estriado lesionado: O NF- κ B é um regulador essencial de um grande número de genes envolvidos no processo inflamatório. Além disso, é um dos reguladores primários da expressão de COX-2 em diferentes condições patológicas (Tanabe e Tohnai 2002; Gasparini e Feldmann, 2012). Considerando o aumento de COX-2 em animais tratados com L-DOPA, nosso próximo passo foi verificar a expressão de NF- κ B no estriado lesionado destes animais.

Um efeito geral do tratamento foi encontrado ($F(2, 9) = 8,759$, $p < 0,05$; figura 30). A lesão com 6-OHDA não levou a uma alteração significativa na expressão de NF- κ B ($p > 0,05$ vs. sham); entretanto, o tratamento crônico com L-DOPA em animais hemiparkinsonianos aumentou significativamente a expressão deste gene de resposta imediata no estriado lesionado ($p < 0,05$ vs. sham).

Figura 30: Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre a expressão do fator de transcrição NF-κB . (A) Western blots representativos para NF-κB p65 (65 kDa) e α-tubulina (50 kDa, controle). (B) A quantificação de NF-κB em animais sham, lesionados com 6-OHDA e hemiparkinsonianos tratados por 21 dias com L-DOPA demonstrou que a L-DOPA induziu um aumento robusto na expressão deste fator de transcrição no estriado lesionado. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguida por Bonferroni; $n = 4$ /grupo. Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Uma diminuição moderada na expressão de astrócitos é encontrada ao longo da curva temporal de tratamento com L-DOPA no estriado lesionado como um todo: O aumento da expressão de COX-2 pode ser causado por/levar a um aumento de citocinas produzidas principalmente por células gliais no SNC (Samad *et al.*, 2001; Watkins *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2006). Além disso, Bortolanza *et al.* (2015a) e Mulas *et al.* (2016) observaram que a expressão de células gliais é aumentada pelo tratamento crônico com L-DOPA, podendo estar relacionada à LID em modelos de ratos hemiparkinsonianos. Tendo em vista essa interação “inflamação x glia x LID”, investigamos se o padrão de expressão glial em camundongos seguiria o padrão da expressão de COX-2 na curva temporal de tratamento com L-DOPA.

Ao analisarmos a expressão de astrócitos, observamos que existe um efeito geral do tratamento sobre a expressão de células GFAP+ nas três regiões estriatais (rostral: $F(5, 120) = 9,920$, $p < 0.05$; figura 31A; medial: $F(5, 162) = 29,12$, $p < 0.05$; figura 31B; caudal: $F(5, 77) = 19,27$, $p < 0,05$; figura 31C). Os camundongos apresentaram uma alta expressão deste tipo glial quando lesionados no estriado ($p < 0,05$ vs. sham), e o tratamento com L-DOPA não alterou esta expressão nos primeiros dias analisados (dias 1, 7 e 14: $p < 0,05$ vs. sham).

No vigésimo primeiro dia de tratamento, os camundongos apresentam uma diminuição da expressão de astrócitos nas regiões medial e caudal do estriado em comparação ao grupo apenas lesionado (dia 21: $p < 0,05$ vs. sham e vs. 6-OHDA). Na região rostral, uma queda no número de astrócitos no 21º dia de tratamento não foi observado ($p > 0,05$ vs. 6-OHDA). Usado como controle positivo, também não houve mudança no NAc (dado não demonstrado).

Figura 31: Análise de células GFAP+ no estriado de camundongos lesionados tratados com L-DOPA. (A) No estriado rostral, existe um aumento significativo na expressão de GFAP causado pela lesão com 6-OHDA, que se mantém alto durante os 21 dias de tratamento com L-DOPA. (B) Assim como no estriado rostral, existe um aumento no número de astrócitos após a lesão, entretanto esse aumento tem uma queda parcial no vigésimo primeiro dia de tratamento. (C) No estriado caudal, o padrão se repete, com aumento de astrócitos causado pela lesão e uma diminuição parcial no número de células imunorreativas para GFAP. *p < 0,05 vs. sham; # p < 0,05 vs. 6-OHDA sem L-DOPA (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni, n = 7/grupo). Valores apresentados em forma de média ± EPM.

O tratamento crônico com L-DOPA leva a aumento na expressão de astrócitos no estriado de camundongos na região específica da lesão: A curva em U invertido na expressão temporal de astrócitos após um processo de injúria, conforme encontrado no dado anterior, é esperada (Jing *et al.*, 2013). Portanto, para investigar se a queda do número de células GFAP+ foi consequência de uma inativação comum após a lesão e não uma consequência do tratamento com L-DOPA, comparamos animais lesionados com 6-OHDA tratados por 21 dias com L-DOPA com animais nas mesmas condições experimentais, porém tratados com salina.

Similar ao observado em ratos (Bortolanza *et al.*, 2015a), observamos um efeito geral sobre a expressão de GFAP na área dorsolateral das três regiões analisadas (rostral: $F(3, 24) = 34,03$, $p < 0,05$; medial: $F(3, 24) = 26,12$, $p < 0,05$; caudal: $F(3, 24) = 13,41$, $p < 0,05$; figuras 32A-32C). A lesão com 6-OHDA (21 dias) induziu um aumento significativo na expressão de GFAP ($p < 0,05$ vs. Sham), e esta expressão diminuiu após mais 21 dias de tratamento com salina ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA 21d). Entretanto, houve um aumento robusto sobre a expressão de GFAP após o tratamento com L-DOPA ($p < 0,1$ vs. Salina 21d).

Como observado na figura 33, a microinjeção com 6-OHDA após 21 dias acarreta em uma astrogliose intensa em todo o estriado lesionado. Após mais 21 dias de tratamento com salina, é possível observar uma diminuição robusta no número de astrócitos ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA). Entretanto, o tratamento com L-DOPA aumentou a quantidade de células GFAP+ especificamente na área do estriado lesionada. As imagens em maior aumento que apontam a marcação de GFAP na área dorsolateral do estriado lesionado estão demonstradas no Material Suplementar 3.

Figura 32: Quantificação de GFAP na área lateral do estriado lesionado. (A) Na região rostral do estriado lesionado, os animais lesionados com 6-OHDA apresentaram astrogliose no estriado dorsolateral; os animais tratados 21 dias com salina apresentaram a marcação de células GFAP+ na área lateral (lesionada) reduzida em comparação aos animais lesionados com 6-OHDA e os lesionados tratados com L-DOPA (21 dias). O padrão se repetiu na região (B) medial e (C) caudal. * $p < 0,05$ vs. salina (Student teste t não pareado, $n = 6-7$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. Sal: salina.

Figura 33: Fotomicrografias representativas da imunomarcção para GFAP. (A) Os animais sham apresentam marcação pouco visível de astrócitos, melhor observadas em maior aumento (A'). Destaque para a imagem da morfologia do astrócitos marcado no grupo sham, com um corpo celular de pequeno tamanho. (B) Os animais lesionados com 6-OHDA apresentam alta astrogliose, decorrente da lesão dopaminérgica. (B') A fotomicrografia em maior aumento indica a alteração marcante da morfologia astrocitária, com destaque em maior aumento para o crescimento do tamanho do corpo celular dos astrócitos pós-lesão. (C) Existe uma diminuição significativa no número de astrócitos nos animais tratados com salina após 21 dias; em maior aumento (C'), observamos que a morfologia dessas células difere dos outros grupos. (D) Em comparação aos animais tratados com salina, existe um aumento na marcação de astrócitos reativos na parte lateral, associada à perda de fibras dopaminérgicas, nos animais tratados com L-DOPA. (D') A figura em maior aumento aponta a presença de astrócitos preferencialmente na região lesionada, com morfologia similar à de astrócitos pós-lesão.

O tratamento crônico com L-DOPA não leva a alterações na expressão de micróglia no estriado como um todo: Na análise de expressão de Iba-1, marcador de células microgliais, observamos que o número de células imunorreativas é alto em todos os grupos analisados (incluindo o grupo sham), sem diferença estatística entre si (rostral: $F(5, 120) = 1,480$, $p > 0.05$; figura 34A; medial: $F(5, 162) = 1,459$, $p > 0.05$; figura 34B; caudal: $F(5, 78) = 1,927$, $p > 0.05$; figura 34C). A análise pós-hoc indicou que existe uma tendência ao aumento de expressão de micróglia após a lesão com 6-OHDA, porém não significativa ($p = 0.09$). Por outro lado, o tratamento com L-DOPA não apresentou nenhuma alteração significativa na expressão microglial em nenhuma das três regiões avaliadas em comparação aos animais sham ($p > 0,05$) ou aos animais tratados 21 dias com salina ($p > 0,05$, dados não mostrados).

Figura 34: Análise de células Iba-1+ no estriado de camundongos lesionados tratados com L-DOPA. (A) No estriado rostral, a lesão com 6-OHDA ou o tratamento com L-DOPA não foram capazes de induzir qualquer tipo de alteração no número de células Iba-1+. (B) Apesar de o grupo 6-OHDA indicar tendência a aumentar os níveis de micróglia, não existe diferença estatística entre os grupos sham, lesionado ou tratados com L-DOPA ao longo dos 21 dias. (C) A ausência de alteração no número de células microgliais se mantém no estriado caudal. ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni; n = 7/grupo. Valores apresentados em forma de média ± EPM.

O tratamento crônico com L-DOPA pode induzir a mudanças morfológicas da micróglia no estriado dorsolateral lesionado de camundongos: Apesar de não haver diferenças significativas na quantificação da expressão de Iba-1, seria possível que a morfologia destas células estivesse alterada após o tratamento com L-DOPA, conforme demonstrado anteriormente (Gomes *et al.*, 2015). Em seguida, verificamos o estado de

ativação na área da lesão (dorsolateral) para saber se o tratamento crônico com L-DOPA modificaria a atividade glial. A avaliação da morfologia das células Iba-1+ indicou um efeito geral significativo na área dorsolateral das três regiões analisadas (rostral: $F(3, 24) = 8,854$, $p < 0,05$; medial: $F(3, 24) = 16,33$, $p < 0,05$; caudal: $F(3, 24) = 12,8$, $p < 0,05$; figuras 35A-35C). Enquanto a lesão com 6-OHDA (21 dias) levou a um aumento significativo no número de micróglia reativa ($p < 0,05$ vs. Sham), este número reduziu após mais 21 dias de tratamento com salina ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA 21d). Diferentemente dos astrócitos, o número de micróglia reativa não foi modificado pelo tratamento crônico com L-DOPA em nenhuma das três regiões analisadas em comparação ao grupo salina ($p > 0,05$ vs. Salina 21d), apesar de haver tendência nas regiões medial e caudal ($p < 0,1$ vs. Salina 21d).

Na figura 36, é possível observar que a microinjeção com 6-OHDA após 21 dias acarretou em uma intensa marcação para micróglia reativa (de forma amebóide) em todo o estriado lesionado em comparação aos animais sham, apesar de não haver diferença significativa na expressão total de células). Após mais 21 dias de tratamento com salina, entretanto, há uma alteração significativa da morfologia celular de volta a sua forma quiescente ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA; figura 36), e o tratamento com L-DOPA não modifica significativamente a morfologia destas células (apesar de estas células aparentarem um estado morfológico intermediário entre as células quiescentes - representados pelos animais sham – e as células ativas – representadas pelo grupo 6-OHDA).

Figura 35: Quantificação de micróglia reativa na área lateral do estriado lesionado. (A) Na região rostral, a lesão resultou em um aumento no número de células Iba-1 reativas, e o pós-tratamento com salina (lesão 21d + salina 21d) levou a uma diminuição destas células. O tratamento com L-DOPA não alterou a morfologia das células em comparação ao grupo salina. O padrão se repetiu para as regiões medial (B) e caudal (C). * $p < 0,05$ vs. Sham; # $p < 0,1$ vs. Sal (21d). (ANOVA de uma via seguida por análise de Bonferroni; $n = 7/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. Sal: salina.

Figura 36: Fotomicrografias representativas da imunomarcção para Iba-1 e caracterização de seu estado reativo. (A) Os animais sham apresentam basalmente marcação intensa de Iba-1 na região medial do estriado; (A') Fotomicrografias ampliadas do estriado dorsolateral com destaque para a morfologia microglial neste grupo, indicando estado de micróglia quiescente. (B) Os animais lesionados com 6-OHDA apresentam tendência a um aumento na densidade de células Iba-1+, ainda que não significativa; (B') Apesar de não haver diferença significativa na expressão, essas células apresentam morfologia de micróglia ativada, conforme destacado em figura de maior aumento. (C) Nos animais tratados com salina, ainda há predominância de micróglia em todo o estriado medial; (C') Entretanto, a morfologia destas células, conforme observado em maior aumento, sugere que o estado de ativação destas células está quiescente. (D) O tratamento com L-DOPA não indicou diferença significativa na expressão de células Iba-1+, assim como (D') na morfologia das células, apesar de haver uma tendência ao aumento no número de micróglia reativa, demonstrada em maior aumento.

DISCUSSÃO – Capítulo 1

Como proposta inicial do trabalho, tivemos o objetivo de avaliar a expressão de fatores inflamatórios no encéfalo de animais parkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA. Observamos que (i) o número de animais que apresentaram AIMS aumentou gradativamente ao longo do tratamento, atingindo seu pico no último dia de análise, aos 21 dias. (ii) Este aumento na LID não foi acompanhado por uma alteração da perda dopaminérgica no estriado, que se manteve constante; entretanto (iii) acompanhou um aumento na expressão de FosB, gene de resposta imediata classicamente associado à LID. (iv) A expressão de COX-2 também aumentou ao longo do tempo de tratamento com L-DOPA, (v) mantendo uma correlação positiva significativa com a manifestação da LID a partir do 14º dia de tratamento. (vi) A COX-2 é produzida principalmente por neurônios, que estão localizados em áreas com maior perda dopaminérgica. (vii) O aumento de COX-2 foi acompanhado pelo aumento na síntese de PGE₂ no estriado de animais discinéticos. (viii) O tratamento crônico com L-DOPA em animais parkinsonianos também levou ao aumento na expressão do gene de resposta imediata NF-κB. (ix) Por fim, o tratamento com L-DOPA foi capaz de manter a expressão de astrócitos alta na área lesionada em DA, e (x) apresentou uma tendência em modificar a expressão do fenótipo microglial no estriado.

COX-2: agente neuroinflamatório ou gene de resposta imediata?

A COX-2 como agente inflamatório: As células do encéfalo são capazes de iniciar e/ou amplificar uma resposta inflamatória característica, envolvendo a síntese de citocinas, proteínas da fase aguda, ativação de complemento, liberação de prostaglandinas e ROS. Dados da literatura indicam que a COX-2 e suas prostaglandinas derivadas, como a PGE₂, aumentam o processo inflamatório neurodegenerativo da DP, induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias nas células da astroglia e potencializam a excitotoxicidade do glutamato, acelerando a neurodegeneração. Baseado em nossos resultados, é possível hipotetizar que o aumento de COX-2 no estriado discinético faça parte de um quadro neuroinflamatório que faça parte do surgimento da LID.

Aqui, nós demonstramos que o tratamento crônico com L-DOPA em camundongos foi capaz de aumentar a expressão de COX-2 de modo concomitante à manifestação da LID. O aumento de COX-2 apresentou uma correlação positiva significativa com a LID somente quando a manifestação desta desordem se tornou significativa, no 14º dia; e atingiu seu maior índice de correlação quando a LID atingiu seu pico dentre os dias analisados, no 21º dia. Os níveis de PGE₂ medidos através da técnica de ELISA complementaram estes resultados, ao

demonstrarem que os animais tratados com L-DOPA tiveram um aumento significativo na produção desta prostaglandina no estriado lesionado. O aumento de COX-2 em animais tratados cronicamente com L-DOPA/apresentando LID já foi demonstrado anteriormente (Bortolanza *et al.*, 2015b). Neste trabalho, nosso grupo também demonstrou que o aumento de COX-2 no estriado de ratos foi prevenido pelo tratamento com 7-Nitroindazol, um inibidor da NOS neuronal (nNOS) que também previne/bloqueia robustamente a LID.

Na DP, a expressão de COX-2 parece estar potencialmente envolvida com a neurodegeneração (Feng *et al.*, 2002; Sánchez-Pernaute *et al.*, 2004; Teismann e Ferger, 2001; Teismann *et al.*, 2003; Wang H *et al.*, 2005). Alguns dados indicam que a expressão de COX-2 na DP parece levar a um mecanismo típico de propriedades inflamatórias dos prostanoídes, induzindo sua produção principalmente em células gliais na SNpc (Teismann *et al.*, 2003). Reforçando esta hipótese, camundongos *knockout* para COX-2 são mais resistentes à intoxicação mediada pelo MPTP (Feng *et al.*, 2002; 2003; Teismann *et al.*, 2003).

Entretanto, este parece não ser um mecanismo comum à LID. Em dados prévios do grupo, a COX-2 surgiu principalmente em neurônios estriatais pós-sinápticos (Bortolanza *et al.*, 2015b). Neste trabalho, corroboramos que a produção de COX-2 em camundongos ocorre principalmente em neurônios, sem colocalizar com células gliais, como micróglia e astrócitos. Isto pode implicar que a COX-2 tenha uma função diferente da sugerida para a DP. Neste caso, o aumento de COX-2 encontrado no estriado discinético pode ser consequência de um quadro neuroinflamatório ocorrendo devido ao desbalanço entre a L-DOPA (e consequentemente DA) e o glutamato sem levar à neurodegeneração, uma vez que a administração constante de L-DOPA induz o aumento extracelular transitório marcante de DA e glutamato, criando um “ambiente” pró-inflamatório (Farber e Kettenmann, 2005) mas sem levar a um aumento da perda neuronal que ocorre com a DP.

Fortalecendo a hipótese da neuroinflamação no estriado de animais discinéticos, também encontramos aumento do fator de transcrição normalmente associado a processos inflamatórios, o NF- κ B. O fator de transcrição NF- κ B possui diversas funções no SNC. Ele é um regulador crucial da expressão de um grande número de genes envolvidos na inflamação. Além disso, é um dos principais reguladores da expressão COX-2 em diferentes situações fisiológicas e patológicas (Tanabe e Tohnai, 2002 e Gasparini e Feldmann, 2012). O NF- κ B é induzível e regula processos inflamatórios que exacerbam doenças como esclerose múltipla, enxaqueca, doença de Alzheimer e a própria DP (Kempuraj *et al.*, 2016; Mc Guire *et al.*,

2013; Neeb e Reuter, 2007; Rai *et al.*, 2017). O aumento de COX-2 encontrado em nosso trabalho pode ser dependente do aumento de NF- κ B, funcionando como mecanismos complementares na resposta neuroinflamatória.

A COX-2 como gene de resposta imediata: Entretanto, a neuroinflamação não é a única explicação plausível para o surgimento de fatores classicamente pró-inflamatórios no estriado de animais discinéticos, como a COX-2 e o fator de transcrição NF- κ B. Conforme descrito anteriormente, a COX-2 é constitutiva em regiões que envolvem formação de LTP e plasticidade sináptica, como o giro denteado do hipocampo. Nestas regiões, a COX-2 é capaz de ser produzida em neurônios com aferências glutamatérgicas (Yamagata *et al.*, 1993) envolvidos na formação de LTP (Bliss e Collingridge, 1993).

Com relação à LID, tem sido postulado que esta desordem ocorre devido a uma atividade anormal da via corticoestriatal. A expressão aumentada da enzima COX-2 poderia ser consequência do aumento da formação de LTP estriatal. Calabresi *et al.* (2000; 2008) através de seus trabalhos sugerem que a ativação cortical repetitiva pode gerar LTD ou LTP em sinapses corticoestriatais dependendo do subtipo de receptor de glutamato ativado durante a fase de indução dessas formas de plasticidade sináptica. Neste caso, a DA desempenharia uma função importante na regulação de ambas as formas de plasticidade. Entretanto, a ausência deste neurotransmissor suprimiria a plasticidade corticoestriatal fisiológica através de alterações bioquímicas e morfológicas dentro do estriado. Este quadro, associado ao tratamento crônico com L-DOPA resultaria em uma LTP "patológica", dependendo da ativação dos receptores de glutamato (NMDA) localizados em MSNs, que poderia desempenhar um papel na geração de LID. Baseado nestes trabalhos, é possível sugerir que o aumento de COX-2 no estriado seja uma consequência desta ativação corticoestriatal patológica após o tratamento crônico com L-DOPA em animais parkinsonianos.

Um outro fator a ser considerado é a expressão da COX-2 exclusivamente em neurônios, enquanto na DP, onde esta enzima está classicamente associada a um evento neuroinflamatório, a COX-2 é, em sua maior parte, produzida pelas células gliais (Feng *et al.*, 2002; Sánchez-Pernaute *et al.*, 2004; Teismann e Ferger, 2001; Teismann *et al.*, 2003; Wang H *et al.*, 2005). O fato de esta enzima estar sendo produzida principalmente em neurônios juntamente a proteínas resultantes da ativação de genes de resposta imediata classicamente associados à LID, como o FosB (ver figura 25), sugere que esta proteína também pode estar funcionando como um gene de resposta imediata (Maier *et al.*, 1990; Lanahan e Worley,

1998; Crofford, 1997; Bazan e Allan, 1996), agindo como um importante fator no surgimento desta LTP “patológica” envolvida com a LID.

O FosB/ Δ FosB é um gene de resposta imediata que, assim como a COX-2, desempenha um papel essencial nas mudanças adaptativas de longo prazo no encéfalo. O surgimento deste fator está associado a diversas situações patológicas, como a DP, adicção a drogas, depressão e tratamento antidepressivo. Este protooncogene apesar de estar presente de forma constitutiva no estriado, é induzido ao aumento de uma forma específica e por muitos tipos de perturbações crônicas. Uma vez induzido, ele persiste por longos períodos de tempo devido à sua incomum estabilidade. Conforme esperado, aqui observamos que o tratamento crônico com L-DOPA foi capaz de induzir a expressão de FosB na região depletada de DA ao longo do tempo, de maneira similar à COX-2. Os efeitos transcricionais do FosB são complexos porque a proteína pode funcionar como ativador transcricional e repressor (McClung *et al.*, 2004). Na LID, o FosB representa um marcador de atividade celular estriatal e este aumento está diretamente relacionado à manifestação de AIMs. Neste caso, tanto o FosB quanto a COX-2 podem ser resultado da ativação desregulada e persistente dopaminérgica e glutamatérgica, que surgem conforme a LID se instala (Jenner, 2008b).

Da mesma forma, o NF- κ B também pode estar envolvido na plasticidade estriatal que ocorre em animais discinéticos. O NF- κ B é constitutivamente ativado nos neurônios glutamatérgicos. O NF- κ B ativado pode ser transportado de forma retrógrada de sinapses ativadas para o núcleo para traduzir processos de curto prazo para mudanças de longo prazo, como o crescimento de axônios, o que é importante para a memória de longo prazo. Conforme demonstrado por Kaltschmidt e Kaltschmidt (2015), animais *knockout* para a subunidade p65 deste fator de transcrição ou a inibição do NF- κ B neuronal pelo repressor I κ B resultam em defeitos na aprendizagem e na memória. Da mesma forma, camundongos *knockout* para a subunidade p50 têm uma capacidade de aprendizagem mais baixa e são sensíveis a neurotoxinas. Em resumo, é possível hipotetizar que tanto o aumento de COX-2 quanto de NF- κ B no estriado estão relacionados a um processo neuroinflamatório que está relacionado à alteração morfológica e funcional envolvida na plasticidade estriatal relacionada à LID.

O estriado dorsolateral é fundamental para a fisiopatologia da LID. A infusão local de L-DOPA no estriado depletado de DA pode induzir movimentos discinéticos em roedores (Carta *et al.*, 2006). A sinalização alterada e o aumento na expressão de genes de resposta imediata (por exemplo, expressão de FosB) no estriado dorsal lesionado estão ligadas à LID

(Andersson *et al.*, 1999; Cenci *et al.*, 1999; Fasano *et al.*, 2010; Westin *et al.*, 2007). Aqui encontramos um aumento específico de COX-2, NF- κ B, astrócitos e micróglia ativada na região dorsolateral do estriado, sugerindo que o aumento destes fatores na área lesionada pode estar envolvido com a manifestação da LID. Estes dados são condizentes com trabalhos de outros grupos, que mostram um aumento de fatores pró-inflamatórios, como citocinas, no estriado dorsolateral lesionado de ratos após administração de L-DOPA (Barnum *et al.*, 2008; Mulas *et al.*, 2016).

Células gliais e seu envolvimento na LID:

Além da COX-2, outros fatores inflamatórios podem participar na origem da LID. Nosso grupo e outros recentemente descreveram que a expressão de astrócitos e micróglia se encontra aumentada após o tratamento crônico com L-DOPA (Bortolanza *et al.*, 2015a; Mulas *et al.*, 2016), apesar de resultados conflitantes também terem sido descritos (Maeda *et al.*, 2008). Neste trabalho, encontramos um aumento das células gliais após a administração de 6-OHDA (robusto nos astrócitos e visível, porém não significativo, na micróglia), e o tratamento com L-DOPA inicialmente não foi capaz de modificar esta expressão. Entretanto, a análise da expressão e/ou atividade de células gliais demonstrou que o tratamento crônico com L-DOPA manteve a expressão de astrócitos elevadas especificamente na região da lesão dopaminérgica, onde também encontramos aumento na expressão de FosB e COX-2, e sugeriu um aumento da ativação microglial na área lesionada do estriado.

Os astrócitos, apesar de classicamente serem conhecidos como responsáveis pela manutenção da homeostase neuronal e como neuroprotetores, uma vez que removem moléculas tóxicas do espaço extracelular e liberam fatores tróficos e moléculas antioxidantes (Buffo *et al.*, 2008; Burda e Sofroniew, 2014; Rappold e Tieu, 2010; Sofroniew e Vinters, 2010), também podem estar envolvidos na resposta neuroinflamatória que ocorre em diversas doenças neurodegenerativas, como a DP (Hirsch e Hunot, 2009). A reatividade de astrócitos foi originalmente caracterizada por alterações morfológicas (hipertrofia, remodelação de processos) e a superexpressão da proteína ácida fibrilar glial (GFAP). No entanto, não está claro como as funções de suporte normais dos astrócitos são alteradas pelo seu estado reativo. Na DP, em que a disfunção neuronal e a reatividade de astrócitos podem ocorrer ao longo de vários anos ou décadas, a questão é ainda mais complexa e altamente debatida, com vários relatórios conflitantes (Haim *et al.*, 2015).

Os astrócitos aumentados especificamente na área lesionada após o tratamento com L-DOPA podem estar envolvidos em diferentes funções. Conforme discutido anteriormente, a atividade neuronal estriatal está descrita como aumentada na LID (Calabresi *et al.*, 2008; Konradi *et al.*, 2004; Padovan-Neto *et al.*, 2013, 2014; Pavón *et al.*, 2006), e a administração de L-DOPA causa um grande aumento no fluxo sanguíneo para o estriado dorsolateral em ratos discinéticos (Ohlin *et al.*, 2012). Os processos astrocitários que envolvem os vasos sanguíneos desempenham um papel fundamental nos mecanismos de "acoplamento neurovascular", através do qual o fluxo sanguíneo local para uma região pode ser adaptado às demandas metabólicas dos neurônios (Attwell *et al.*, 2010). Além de estar envolvido no acoplamento neurovascular, os astrócitos estriatais em ratos discinéticos expressam o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF; Ohlin *et al.*, 2011), fator que indiretamente indicaria o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Westin *et al.*, 2006). A ativação astrocitária estriatal detectada neste estudo pode estar funcionalmente relacionada ao aumento do fluxo sanguíneo e à proliferação endotelial associada à LID (Bortolanza *et al.*, 2015a).

Entretanto, é importante lembrar que sob condições patológicas, os astrócitos liberam citocinas pró-inflamatórias e outras moléculas tóxicas que são prejudiciais aos neurônios dopaminérgicos (Rappold e Tieu, 2010). Na DP, a glia - incluindo os astrócitos - poderia estar envolvida na produção excessiva de produtos tóxicos, como NO ou citocinas características do processo inflamatório, ou relacionadas a uma liberação defeituosa de agentes neuroprotetores, como pequenos antioxidantes com propriedades de eliminação de radicais livres ou fatores neurotróficos peptídicos (revisado em Del Bel *et al.*, 2016; Halliday e Stevens, 2011; Hunot *et al.*, 1996).

A micróglia também pode ter participação importante na manifestação da LID. Conforme descrito em outros trabalhos, as alterações moleculares no estriado de ratos discinéticos acompanhavam uma ativação intensa da micróglia (Bortolanza *et al.*, 2015a; Mulas *et al.*, 2016). Apesar de nossa análise não ter indicado uma diferença significativa na expressão de Iba-1 nos animais tratados com L-DOPA, uma análise mais aprofundada tornou-se necessária, uma vez que a morfologia dessas células é um importante determinante de sua atividade inflamatória. Fortalecendo esta ideia, encontramos uma tendência no estriado de camundongos que indicasse uma alteração no estado de ativação da micróglia. Mesmo que tenhamos analisado somente a área do estriado lesionada, a intensidade da lesão pode ser um fator determinante para deflagrar a atividade microglial possivelmente envolvida com a

discinesia, semelhante ao demonstrado para COX-2. Um estudo mais aprofundado é necessário para melhor compreender a participação da micróglia na LID.

O efeito relativamente modesto da L-DOPA sobre a expressão microglial e de astrócitos específico na área lesionada contrasta com o aumento ocorrido em ratos (Bortolanza *et al.*, 2015b). Isto pode ter acontecido por três motivos principais: o primeiro seria por uma possível diferença entre os modelos experimentais, intrínseca à espécie utilizada. O segundo, e possivelmente mais importante, seria devido ao local de microinjeção da toxina 6-OHDA para a degeneração da via nigroestriatal. O implante da microagulha juntamente à administração de 6-OHDA no estriado resulta em uma gliose intensa (Barker *et al.*, 1996; Henry *et al.*, 2009; Stott e Barker, 2014; Stromberg *et al.*, 1986), que pode mascarar a capacidade da L-DOPA de induzir uma alteração significativa no número de células gliais. Este achado difere do de ratos, provavelmente porque a lesão induzida nos ratos nestes estudos (Bortolanza *et al.*, 2015a; Mulas *et al.*, 2016) ocorreu no feixe prosencefálico medial, sem afetar diretamente o estriado. O terceiro motivo poderia ser a intensidade da lesão acompanhada à dose de L-DOPA utilizada. Este fator é evidenciado no trabalho de Ramírez-García *et al.* (2015). O estudo foi realizado em ratos, semelhante ao descrito por Bortolanza *et al.* (2015a). Neste estudo, os animais foram tratados com 100 mg/kg de L-DOPA e foi observado uma expressão intensa de astrócitos e micróglia ativada no estriado lesionado. Desta forma, o aumento da dose de L-DOPA ou a utilização de um modelo de camundongos com a lesão no feixe ou na SN poderia excluir esse viés, garantindo que o tratamento com L-DOPA aumentaria os níveis de glia nos modelos de camundongo. Ainda assim, conseguimos observar uma tendência à modificação no estado de ativação destas células após o tratamento com L-DOPA.

Em resumo, podemos hipotetizar que o surgimento da enzima COX-2 (e consequentemente de PGE₂), assim como o aumento do número de astrócitos e da ativação microglial na região dorsolateral, podem fazer parte de um processo neuroinflamatório envolvido com a LID. O aumento de células gliais pode ser responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias no estriado, criando um microambiente inflamatório (juntamente à L-DOPA administrada exogenamente e o glutamato) que pode colaborar com a expressão da enzima COX-2 e na origem e desenvolvimento da LID. Para confirmar esta hipótese, nosso próximo objetivo no trabalho foi verificar se o tratamento com L-DOPA ou DA em culturas primárias de astrócitos e micróglia resultaria em um aumento da atividade glial e da produção de fatores inflamatórios, como citocinas.

CAPÍTULO 2 – O EFEITO DA L-DOPA/ DA E GLUTAMATO SOBRE A
ATIVIDADE GLIAL E A PRODUÇÃO DE FATORES
INFLAMATÓRIOS

O tratamento exógeno com L-DOPA e DA diminui a produção de glutamato pelos astrócitos: Tendo em vista o objetivo de investigar se o tratamento com o precursor L-DOPA ou seu derivado, o neurotransmissor DA conseguiria induzir uma resposta inflamatória em células gliais, utilizamos uma cultura primária de astrócitos e analisamos a expressão de GFAP e produção de glutamato como um marcador do estado de ativação dessas células, além de medir LDH para confirmar a toxicidade destes compostos nas concentrações utilizadas.

Inicialmente validamos nosso modelo utilizando um ativador inflamatório clássico de células gliais, o LPS, que serviu como controle positivo para confirmar a possível ativação dos astrócitos induzida por agentes inflamogênicos. O tratamento de 24h com LPS induziu um aumento de expressão de GFAP ($t=5,483$, $df=8$, $p < 0,05$) sem, entretanto, levar a um processo de citotoxicidade, detectado através do vazamento de LDH para o meio ($t=0,3703$, $df=6$, $p > 0,05$). A produção das citocinas avaliadas também foram aumentadas pelo tratamento com LPS, TNF- α ($t=4,984$, $df=10$, $p < 0,05$), IL-1 β ($t=13,48$, $df=10$, $p < 0,05$) e IL-6 ($t=24,58$ $df=10$, $p < 0,05$). A produção de glutamato pelos astrócitos não foi alterada pelo tratamento com LPS ($t=2,424$, $df=10$, $p > 0,05$; Material Suplementar 4).

O tratamento com L-DOPA não foi capaz de levar a uma alteração na expressão de GFAP em nenhuma das concentrações utilizadas ($F(2, 9) = 0,5901$, $p > 0,05$; figuras 37A e 37B), assim como o tratamento com DA ($F(2, 9) = 2,185$, $p > 0,05$; figuras 37A e 37C). Porém, o tratamento com L-DOPA e DA induziram uma redução significativa na produção de glutamato (L-DOPA: $F(2, 15) = 18,06$, $p < 0,05$; DA: $F(2, 19) = 8,227$, $p < 0,05$; figuras 37D e 37E, respectivamente). Surpreendentemente, as duas concentrações analisadas de L-DOPA e DA (3 e 10 μ M) reduziram significativamente a liberação de glutamato pelos astrócitos de forma concentração-dependente (L-DOPA/DA 3 e 10 μ M: $p < 0,05$ vs. controle).

Para confirmar se as concentrações de L-DOPA ou DA seriam tóxicas para os astrócitos, medimos a liberação da enzima citosólica de lactato desidrogenase (LDH) no meio de cultura, uma técnica comumente usada como medida de citotoxicidade por comprometimento da membrana. Observamos que tanto a L-DOPA ($F(2, 12) = 2,991$, $p > 0,05$; figura 37F) quanto a DA ($F(2, 9) = 3,677$, $p > 0,05$; figura 37G) não levaram a alterações na liberação de LDH pelas células, indicando que as concentrações utilizadas não foram tóxicas.

Figura 37: Análise do efeito da L-DOPA/DA sobre a ativação de astrócitos. (A) Western blots representativos para GFAP (55 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (B-C) A quantificação de GFAP em culturas primárias de astrócitos demonstrou que tratamento com L-DOPA ou DA não levou à alteração na expressão desta proteína (n = 5/grupo). (D-E) A análise de liberação de glutamato apontou que as duas concentrações de L-DOPA e DA diminuíram o glutamato extracelular. (F-G). As concentrações de 3 e 10 μ M de L-DOPA e DA não levaram a um aumento de liberação de LDH. * p < 0,05 vs. controle (-) (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. B-C: n = 4/grupo; D-E: n = 6-7/grupo; F-G: n = 4-5/grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento com glutamato exógeno induz o aumento da expressão de GFAP em astrócitos: O aumento da neurotransmissão glutamatérgica em resposta ao tratamento prolongado com L-DOPA tem sido associado à fisiopatologia da LID (Cenci, 2010; Morin e Di Paolo 2014; Huot *et al.* 2013; Ahmed *et al.* 2011; Rylander *et al.* 2009), assim como pode

estar associado a processos inflamatórios no SNC (McNally *et al.*, 2008). Uma vez que o processo inflamatório ocorrente na LID pode ser consequência de uma ativação glial decorrente do desbalanço glutamatérgico, analisamos os efeitos do tratamento com glutamato sobre a ativação astrocitária.

O tratamento com glutamato extracelular levou a um efeito geral significativo sobre a expressão de GFAP ($F(2, 18) = 79,03$, $p < 0,05$; figuras 38A e 38B). A análise pós-hoc demonstrou que ambas as concentrações testadas (50 e 500 μM) foram eficientes em aumentar a expressão de GFAP em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Interessantemente, a menor concentração utilizada - 50 μM - foi mais efetiva que a concentração de 500 μM . Mais uma vez, nenhuma das duas concentrações levou a um quadro de citotoxicidade ($F(2, 9) = 0,9649$, $p > 0,05$; figura 38C).

Figura 38: Análise do efeito do glutamato sobre a ativação de astrócitos. (A) Western blots representativos para GFAP (55 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (B) A quantificação de GFAP em culturas primárias de astrócitos mostrou que o tratamento com glutamato aumentou a expressão desta proteína, sendo a concentração de 50 μM mais efetiva que a de 500 μM ($n = 4/\text{grupo}$). (C) As concentrações de 50 e 500 μM de L-DOPA e DA não aumentaram a expressão de LDH liberado. * $p < 0,05$ vs. controle (-) (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. B: $n = 7/\text{grupo}$; C: $n = 4/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento exógeno com L-DOPA e DA diminui a expressão de Iba-1 e a produção de glutamato pela micróglia: Para confirmar se a micróglia teria uma resposta similar a dos astrócitos frente ao estímulo com L-DOPA/DA, avaliamos os mesmos parâmetros de inflamação utilizados anteriormente.

Novamente validamos o modelo utilizando o inflamogênico LPS. O tratamento de 24h com LPS em células microgliais induziu um aumento robusto na expressão de Iba-1 ($t=25,55$, $df=10$, $p < 0,05$) sem, entretanto, alterar a liberação de LDH para o meio ($t=0,2027$, $df=6$, $p > 0,05$). Como esperado, a produção das citocinas avaliadas aumentou intensamente após o tratamento com LPS, TNF- α ($t=31,19$, $df=12$, $p < 0,05$), IL-1 β ($t=27,86$, $df=10$, $p < 0,05$) e IL-6 ($t=114,4$ $df=10$, $p < 0,05$). Diferentemente dos astrócitos, a produção de glutamato também foi elevada pelo tratamento com LPS ($t=5,488$, $df=14$, $p > 0,05$; Material Suplementar 5).

O tratamento com L-DOPA não alterou a expressão de Iba-1 ($F(2, 12) = 2,040$, $p > 0,05$; figuras 39A e 39B); por outro lado, o tratamento com DA foi efetivo em diminuir a expressão de Iba-1 ($F(2, 12) = 8,292$, $p < 0,05$; figura 39A e 39C). Entretanto, a concentração de 10 μ M de DA foi a única capaz de reduzir significativamente a produção de Iba-1 pela micróglia ($p < 0,05$ vs. controle).

O tratamento com L-DOPA e DA levaram a uma diminuição significativa na liberação de glutamato (L-DOPA: $F(2, 15) = 151,0$, $p < 0,05$; DA: $F(2, 15) = 329,0$, $p < 0,05$; figuras 39D e 39E, respectivamente). Ambas as concentrações utilizadas de L-DOPA e DA reduziram significativamente a liberação de glutamato pela micróglia (L-DOPA/DA 3 e 10 μ M: $p < 0,05$ vs. controle). Tanto a L-DOPA ($F(2, 9) = 0,2190$, $p > 0,05$; figura 39F) quanto a DA ($F(2, 9) = 1,025$, $p > 0,05$; figura 39G) também não modificaram a liberação de LDH pelas células, indicando que essas concentrações também não foram tóxicas para as células microgliais.

Figura 39: Análise do efeito da L-DOPA/DA sobre a ativação de micróglia. (A) Western blots representativos para Iba-1 (17 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (B-C) A quantificação de Iba-1 em culturas primárias de micróglia demonstrou que tratamento com L-DOPA não levou à alteração em sua expressão, mas que a maior concentração de DA (10 μ M) reduziu este marcador microglial. (D-E) A liberação de glutamato extracelular foi reduzida após o tratamento com L-DOPA e DA em ambas as concentrações. (F-G) O tratamento com L-DOPA e DA não levou a um aumento de liberação de LDH. * $p < 0,05$ vs. controle (-) (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. B-C: $n = 5$ /grupo; D-E $n = 6$ /grupo; F-G: $n = 4$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento com glutamato exógeno induz o aumento de Iba-1 nas células microgliais: O tratamento com glutamato extracelular levou a um efeito geral significativo sobre a expressão de Iba-1 ($F(2, 15) = 349,0$, $p < 0,05$; figuras 40A e 40B). Mais uma vez, as duas concentrações (50 e 500 μ M) foram eficientes em aumentar a expressão de Iba-1 em

relação ao grupo controle ($p < 0,05$), conforme demonstrado pela análise pós-hoc. Diferentemente dos astrócitos, o efeito do glutamato sobre a expressão de Iba-1 foi concentração-dependente, com a concentração de 500 μM sendo mais potente que a de 50 μM . As concentrações testadas não modificaram a liberação de LDH ($F(2, 9) = 2,012$, $p > 0,05$; figura 40C).

Figura 40: Análise do efeito do glutamato sobre a ativação de micróglia. (A) Western blots representativos para Iba-1 (17 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (B) A quantificação de Iba-1 em culturas primárias microgliais apontou que o tratamento com glutamato aumentou a expressão desta proteína de modo concentração-dependente. (C) As concentrações de 50 e 500 μM de glutamato não aumentaram a quantidade de LDH no meio extracelular. * $p < 0,05$ vs. controle (-) (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. B: $n = 6/\text{grupo}$; C: $n = 4/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento com L-DOPA/DA e com glutamato tem ações opostas sobre a produção de citocinas pelos astrócitos: Em seguida, verificamos se o tratamento com participantes da neurotransmissão dopaminérgica (L-DOPA/DA) ou glutamatérgica (glutamato) poderia alterar a produção de citocinas tanto por astrócitos quanto por micróglia.

Para tal, estimulamos as células com estes neurotransmissores e analisamos a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6.

Nos astrócitos, observamos que houve um efeito geral de tratamento sobre a produção de TNF- α ($F(6, 49) = 1442,0$, $p < 0,05$) e IL-6 ($F(6, 49) = 6654,0$, $p < 0,05$). A L-DOPA, na concentração de 10 μM , aboliu a produção de TNF- α ($p < 0,05$ vs. controle), enquanto a DA reduziu a produção desta citocina na concentração de 3 μM e a aboliu completamente na de 10 μM ($p < 0,05$ vs. controle). Por outro lado, o tratamento com glutamato aumentou a produção de TNF- α pelos astrócitos, tanto na concentração de 50 quanto de 500 μM ($p < 0,05$ vs. controle).

Na análise para IL-6, a L-DOPA também reduziu a produção da citocina somente na concentração de 10 μM ($p < 0,05$ vs. controle), enquanto a DA diminuiu sua produção nas concentrações de 3 e 10 μM ($p < 0,05$ vs. controle). Diferindo do TNF- α , o glutamato não aumentou a produção de IL-6 em nenhuma das concentrações testadas ($p > 0,05$ vs. controle). Com relação ao IL-1 β , sua produção basal foi virtualmente inexistente e os tratamentos não alteraram esta produção.

Surpreendentemente, a produção microglial das três citocinas analisadas foi virtualmente nula na situação controle e nenhum dos tratamentos utilizados alterou a produção destas citocinas (Tabela 3). Para confirmar a produção de citocinas tanto pelas células microgлияis quanto por astrócitos, utilizamos o LPS, que, conforme descrito anteriormente, aumentou a produção destas três citocinas (ver Material suplementar 4 e 5).

Citocinas	Controle	L-DOPA		DA		Glu	
		3	10	3	10	50	500
	-						
TNF-α	13,8 ± 4,2	10,2 ± 3,4	0,0 ± 0,0*	4,9 ± 2,3*	0,0 ± 0,0*	65,7 ± 0,3*	67,8 ± 0,4*
IL-1β	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
IL-6	108,5 ± 1,0	107,9 ± 0,2	33,8 ± 0,3*	96,4 ± 1,2*	30,9 ± 0,8*	109,8 ± 1,1	103,5 ± 2,4
TNF-α	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
IL-1β	2,0 ± 2,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
IL-6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Tabela 2: Produção das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 em astrócitos e micróglia após tratamento com L-DOPA, DA e glutamato. Enquanto a L-DOPA (10 μM) e a DA (3 e 10 μM) diminuíram robustamente a produção de TNF- α e IL-6 nos astrócitos, o glutamato (50 e 500 μM) aumentou a produção somente de TNF- α . Nas células microgлияis, nenhum dos tratamentos foi eficaz em modificar a produção de citocinas. * $p < 0,05$ vs. controle (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni; $n = 6-8/\text{grupo}$). Valores (ng/ml) apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

DISCUSSÃO – Capítulo 2

No capítulo anterior descrevemos que o tratamento crônico com L-DOPA levou a um aumento na expressão de astrócitos e uma tendência ao aumento na atividade microglial na área lesionada do estriado. De forma coerente, o tratamento com L-DOPA/DA de maneira crônica ou o aumento de glutamato no estriado lesionado de camundongos hemiparkinsonianos poderia levar à produção de fatores inflamatórios, como citocinas, pelos astrócitos e possivelmente pela micróglia. Para mimetizar um quadro de LID onde há a presença excessiva de L-DOPA/DA e glutamato, nosso próximo objetivo foi verificar se a presença de L-DOPA/DA nestas células poderia influenciar a ativação glial e quais seriam os fatores produzidos pelo processo, tais como as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e o glutamato. Além disso, analisamos também se o próprio glutamato seria capaz de induzir um processo inflamatório nas células gliais, através da ativação celular e produção de citocinas. Para tal, utilizamos cultura primária glial de astrócito e micróglia purificadas (Sepulveda-Diaz *et al.*, 2016). Desta forma, é possível determinar se os sistemas de neurotransmissores envolvidos na LID geram uma resposta inflamatória em células gliais específicas, diferente do tipo de resposta de astrócitos e micróglia nesta patologia.

Observamos que (i) a administração de L-DOPA ou DA nos astrócitos não gerou qualquer alteração em sua ativação, vista através da expressão de GFAP. Entretanto, (ii) a administração destes componentes dopaminérgicos surpreendentemente foi capaz de reduzir a liberação de glutamato. Por outro lado, (iii) quando o glutamato foi administrado nos astrócitos, houve um aumento robusto na expressão de GFAP, sendo que a menor concentração utilizada obteve a maior resposta nestas células. Com relação à micróglia, (iv) a administração tanto de L-DOPA quanto de DA reduziu significativamente a expressão de Iba-1 e também de (v) glutamato produzido por essas células. (vi) A administração de glutamato, por outro lado, aumentou a expressão de Iba-1 somente na concentração mais alta utilizada. Por fim, (vii) o tratamento com L-DOPA e principalmente com DA diminuiu a produção de TNF- α e IL-6 em astrócitos, enquanto (viii) o tratamento com glutamato aumentou significativamente a produção de TNF- α nestas células. (ix) A produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 nas células microgliais não foi afetada pelos tratamentos com L-DOPA/DA ou glutamato.

Glutamato, citocinas e neuroinflamação:

O ambiente pró-inflamatório no estriado pode ser induzido por níveis excessivos de glutamato e DA liberados no estriado após a administração de L-DOPA (Farber e

Kettenmann, 2005). Esse ambiente pró-inflamatório poderia exacerbar qualquer processo neuroinflamatório que já estivesse ocorrendo, levando a uma resposta exagerada em condições onde há lesão, como o estriado de pacientes com DP (Gao *et al.*, 2003, Cunningham *et al.*, 2005). Os níveis excessivos de glutamato encontrados no estriado lesionado de encéfalos parkinsonianos são mais prováveis de serem liberados na fenda sináptica pelos neurônios corticais; entretanto, algumas células gliais, como a micróglia, são relatadas como produtoras de glutamato em resposta a estímulos inflamatórios (Domercq *et al.*, 2013) e podem ser contribuintes importantes nos níveis excessivos desse neurotransmissor na DP/LID.

Tem sido evidenciado que o aumento da sinalização corticoestriatal pode contribuir para o desempenho motor anormal característico da LID. O aumento da neurotransmissão glutamatérgica e a ativação e funcionamento dos receptores de glutamato têm sido fortemente associados ao surgimento e permanência da LID, mostrado tanto em pacientes quanto em modelos animais (Ahmed *et al.*, 2001; Calon *et al.*, 2003; Chase e Oh, 2000; Farrand *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 1998; Robelet *et al.*, 2004; Silverdale *et al.*, 2010). Corroborando estes dados, vários trabalhos vêm fornecendo evidências sobre a redução da LID após o antagonismo dos receptores de glutamato (Bibbiani *et al.*, 2005; Blanchet *et al.*, 1998; Hadj Tahar *et al.*, 2004; Kobylecki *et al.*, 2010; Konitsiotis *et al.*, 2000; Mela *et al.*, 2007; Papa e Chase, 1996; Rylander *et al.*, 2009). E, de fato, o único fármaco anti-discinético atualmente usado em pacientes é o antagonista do receptor NMDA, amantadina (Luginger *et al.*, 2000; Verhagen Metman *et al.*, 1998). Fortalecendo ainda mais esta ideia, foi observado que o tratamento com ceftriaxona, um antibiótico da família das cefalosporinas com capacidade de aumentar a expressão dos transportadores de aminoácidos excitatórios, é capaz de reduzir a LID em modelos parkinsonianos (Chotibut *et al.*, 2017).

Várias linhas de pesquisa sugerem que a sinalização do D1R aumenta a excitabilidade dendrítica e a sinalização glutamatérgica em MSNs da via estriatonigral, enquanto a sinalização de D2R exerce o efeito oposto na via estriatopalidal (Surmeier *et al.*, 2007). Conforme demonstrado por nossos resultados, o aumento de glutamato também pode estar diretamente relacionado ao aumento da ativação astrocitária, microglial e da produção de citocinas. Aqui, nós sugerimos uma importante ação do glutamato aumentado no estriado lesionado de animais apresentando LID: este neurotransmissor pode ser fundamental para a geração de uma resposta inflamatória derivada da ativação de células gliais, principalmente dos astrócitos. Demonstramos que a administração de glutamato em culturas de células gliais

induz um aumento na ativação tanto de astrócitos quanto de micróglia, assim como na produção da citocina TNF- α pelos astrócitos, sugerindo que o excesso de glutamato descrito na LID pode resultar em um aumento de produção de fatores pró-inflamatórios, como a citocina TNF- α .

As citocinas são uma grande família de peptídeos solúveis e proteínas liberadas por células do sistema imune, representando os principais reguladores da resposta imune inata e adaptativa. Relatos têm demonstrado que as citocinas e moléculas efetoras relacionadas, além do envolvimento canônico na resposta do tecido à infecção, são dotadas de funções neuromoduladoras específicas. Esses mediadores solúveis da inflamação recentemente ganharam atenção devido à sua capacidade de aumentar a transmissão do glutamato e afetar a sensibilidade sináptica aos neurotransmissores, como ocorre na LID (Aubert, 2005; Cenci, 2010; Farrand *et al.*, 2016; Rossi *et al.*, 2015; Silverdale, 2010).

As citocinas seriam, portanto, mediadores solúveis de uma conversa parácrina e autócrina complexa entre diferentes populações celulares no SNC. As citocinas podem modular a atividade neuronal e sua viabilidade indiretamente, promovendo a liberação de moléculas neuroativas (por exemplo, NO, glutamato, prostaglandinas, neurotrofinas) (Allan e Rothwell, 2001; Montgomery e Bowers, 2012) ou diretamente, através da ativação de seus receptores neuronais no encéfalo e na medula espinhal (Marin e Kipnis, 2013; Vezzani *et al.*, 2011; Viviani *et al.*, 2007).

A micróglia e os astrócitos são as principais fontes de síntese e liberação de citocinas no SNC. Os níveis de citocinas no tecido nervoso são relativamente baixos em condições fisiológicas, mas um aumento múltiplo ocorre rapidamente após situações patológicas como lesões, convulsões ou infecção pelo SNC ou na periferia (Vezzani e Viviani, 2015). Nossos resultados corroboram esta descrição, uma vez que encontramos a produção de citocinas pelas células gliais baixa ou nula quando não estimuladas, e o tratamento com glutamato foi capaz de aumentar a produção de TNF- α nos astrócitos, mas não na micróglia. Como validação do nosso modelo, o LPS foi utilizado e a produção destas citocinas foi aumentado de forma robusta em ambos os tipos celulares, indicando a viabilidade do nosso modelo (Material Suplementar 4 e 5).

No SNC, o TNF- α pode exercer tanto funções homeostáticas quanto fisiopatológicas (Montgomery e Bowers, 2012; Santello e Volterra, 2012). No SNC saudável, o TNF- α possui funções reguladoras em processos fisiológicos cruciais, como plasticidade sináptica (Beattie

et al., 2012; Kaneko *et al.*, 2008), aprendizagem e memória (Baune *et al.*, 2008; Beste *et al.*, 2008), sono (Krueger, 2008), ingestão de alimentos e água (Plata-Salamán, 2001) e fortalecimento sináptico induzidos por astrócitos (Santello *et al.*, 2011). Em condições patológicas, os astrócitos e a micróglia liberam grandes quantidades de TNF- α , sendo esta produção *de novo* um componente importante da resposta neuroinflamatória (Frankola *et al.*, 2011; McCoy e Tansey, 2008; Wyss-Coray e Mucke, 2002) e possivelmente envolvida na LID. O TNF- α em situações patológicas desencadeia uma cascata de mediadores inflamatórios, incluindo metaloproteinases de raiz e metaloproteinases relacionadas, além de transformarem citocinas ligadas à membrana e receptores de citocinas e moléculas de adesão em suas formas solúveis (Leppert *et al.*, 2001). Com relação aos nossos dados, o aumento de TNF- α exacerbado pelo aumento extracelular de glutamato poderia levar a um quadro de neuroinflamação, onde a ação fisiológica desta citocina estaria alterada, contribuindo com a desregulação da plasticidade sináptica ocorrente na LID.

O TNF- α e o glutamato apresentam uma relação intrínseca no SNC. Esta citocina desempenha um papel fisiológico no controle da transmissão sináptica e plasticidade no SNC saudável, modulando o tráfico de receptores de glutamato ionotrópicos. No entanto, os níveis excessivos de TNF- α , como resultado de diferentes tipos de lesões, têm um efeito inibitório sobre os transportadores de glutamato, resultando em aumento da concentração deste neurotransmissor no SNC. Neste contexto, mesmo os menores aumentos no tráfego de receptores de AMPA e/ou NMDA permeáveis ao Ca^{2+} induzidos por TNF- α tornam-se tóxicos para os neurônios (Olmos e Lladó, 2014).

Também já foi descrito que o aumento de TNF- α em situações patológicas aumenta a liberação de glutamato, que, por sua vez, pode aumentar ainda mais a liberação desta citocina, em um círculo vicioso (Olmos e Lladó, 2014). Como o aumento de GFAP e da produção de TNF- α foi encontrada após a administração de glutamato nos astrócitos, é possível que na LID, o aumento de glutamato leve à produção de TNF- α e vice-versa, gerando uma estimulação intensa sobre os neurônios de projeção estriatais, que por sua vez, causariam alterações na plasticidade sináptica e, conseqüentemente, a mudanças comportamentais.

O TNF- α foi medido pela primeira vez no encéfalo (estriado) e no LCR dos pacientes controle e com DP por meio da técnica ELISA *sandwich*. As concentrações de TNF- α no encéfalo e LCR foram significativamente maiores nos pacientes parkinsonianos que no grupo controle. Uma vez que o TNF- α é um transdutor de sinal importante do sistema imunológico

com propriedades citotóxicas e estimuladoras, e esses resultados sugerem que uma resposta imune pode ocorrer na região dopaminérgica nigroestriatal na DP e que o TNF- α pode estar relacionado, pelo menos em parte, pela degeneração neuronal. Infelizmente, não é possível identificar neste estudo se os pacientes estão sob tratamento com L-DOPA ou não (Mogi *et al.*, 1994).

Entretanto, o aumento de TNF- α no estriado lesionado de modelos animais pós-tratamento com L-DOPA foi descrito anteriormente (Mulas *et al.*, 2016). Neste trabalho, o aumento desta citocina foi descrito especificamente em células microgliais. Entretanto, esta análise foi demonstrada em comparação apenas a neurônios, desconsiderando a possível contribuição astrocitária para este processo. De forma complementar, no modelo de cultura primária, observamos que o aumento de TNF- α no estriado lesionado de animais discinéticos pode ocorrer devido à estimulação glutamatérgica e que os astrócitos podem ser uma importante fonte de produção de citocinas nesta patologia.

O aumento de TNF- α especificamente pelos astrócitos condiz com os resultados encontrados no capítulo 1, onde o tratamento com L-DOPA manteve uma elevação de astrócitos na área lesionada do estriado. Isto nos sugere que na LID, o papel do astrócitos seja fundamental para o surgimento deste quadro patológico. O papel dos astrócitos na LID já foi previamente revisado na literatura (Del Bel *et al.*, 2016; Carta *et al.*, 2017). Entretanto, esta é a primeira vez que uma relação direta entre o papel dos astrócitos na LID através da produção de citocinas é sugerida. Outro fator a ser considerado é que a resposta astrocitária ao glutamato foi obtida na menor concentração utilizada, de 50 μ M, enquanto na micróglia, só conseguimos observar aumento de Iba-1 com 500 μ M. Enquanto esta última concentração dificilmente seria uma concentração alcançada no estriado de animais discinéticos, a menor estaria mais próxima do desequilíbrio glutamatérgico descrito na LID, fortalecendo a hipótese da ativação astrocitária como importante fator na manifestação da desordem.

É importante citar também que outras citocinas, como a IL-1 β e a IL-6, assim como as células microgliais também podem estar envolvidas na manifestação da LID. Neste capítulo, para responder às questões levantadas, utilizamos o modelo de cultura primária estimulada com os neurotransmissores envolvidos na LID e verificamos a expressão destas citocinas, mas não encontramos diferenças nos níveis de IL-1 β e IL-6. Entretanto, Barnum *et al.* (2008) descreveu um aumento de IL-1 β no estriado lesionado de ratos tratados com L-DOPA e a redução da LID pelo uso do antagonista de seu receptor. Bortolanza *et al.* (2015a) também

apresentaram o aumento de micróglia no estriado lesionado de ratos, juntamente a outros fatores inflamatórios, como a iNOS.

Apesar de nossos dados fornecerem importantes informações sobre a produção de fatores inflamatórios após o estímulo com neurotransmissores envolvidos na LID, nosso modelo, em comparação a estudos em animais e cérebros de pacientes, apresenta deficiências. Diversos trabalhos sugerem que as modificações neuroquímicas que participam desta desordem ocorrem principalmente devido à interação entre a lesão da via nigroestriatal e o desequilíbrio de neurotransmissores provenientes do tratamento com L-DOPA (Cenci, 2014; Jenner, 2008), assim como o excesso de glutamato liberado pela via corticoestriatal (Del-Bel *et al.*, 2016). As alterações na transmissão corticoestriatal, a supersensibilidade dos receptores de DA e a maquinaria de síntese proteica que caracterizam a doença não podem ser explicadas somente pelo tratamento com L-DOPA, sendo necessária a perda neuronal na SN e nos terminais estriatais associados para que a patologia se manifeste. Aqui, demonstramos que o glutamato, mas não a L-DOPA ou a DA, é capaz de levar à produção de TNF- α . Entretanto, não é possível afirmar que os resultados encontrados em nosso trabalho correspondem fielmente ao que ocorre no modelo *in vivo* da patologia.

Apesar de os estudos em cultura de células purificadas serem extremamente importantes por nos garantir a especificidade da resposta das células gliais ao estímulo dos neurotransmissores, ele não mimetiza por completo o quadro complexo ocorrente no estriado de animais discinéticos. Portanto, não podemos afirmar que estas outras citocinas não estão envolvidas na LID em modelo de camundongos. Por exemplo, o próprio aumento de TNF- α pelos astrócitos pode ser responsável pela proliferação e ativação microglial encontrada em ratos (Kuno *et al.*, 2005), possivelmente mascarada pelo aumento relativamente modesto desta citocina em um quadro de lesão parcial. Mais estudos são necessários para confirmação desta hipótese.

Ação neuroprotetora da L-DOPA/DA:

A hipótese de que a DA em modelos *in vitro* e *in vivo* teria uma ação prejudicial aos neurônios vem sendo discutida de modo consistente, apesar de não haver um consenso neste debate. Em modelos *in vitro*, a toxicidade de componentes dopaminérgicos é amplamente demonstrada, mas são poucos os estudos *in vivo* que reproduzem estes achados. De fato, os trabalhos em geral sugerem que o tratamento crônico com L-DOPA para o tratamento da DP

não leva a um quadro de toxicidade, embora estes dados também sejam controversos (para revisão, Bozzi e Borrelli, 2006).

Em culturas de neurônios, a DA é conhecida por ser tóxica em células em cultivo (Graham *et al.*, 1978; Michel e Hefti, 1990). De fato, a primeira demonstração de apoptose induzida por DA foi obtida em neurônios simpáticos em cultura expostos a concentrações fisiológicas deste neurotransmissor (Ziv *et al.*, 1994). Outros estudos *in vitro* contribuíram para definições mais detalhadas dos mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos tóxicos da DA. A apoptose induzida por DA em neurônios em cultura está associada a dano do DNA, níveis aumentados do fator de transcrição p53 (Daily *et al.*, 1999; Porat e Simantov, 1999), *downregulation* de canais mitocondriais (Premkumar e Simantov, 2002) e ativação da caspase 3 (Hou *et al.*, 2001; Offen *et al.*, 1999) e de NF- κ B, que também foi encontrado elevado em nosso estudo (Barzilai *et al.*, 2001; Barzilai *et al.*, 2003; Daily *et al.*, 2001).

Alterações celulares apoptóticas também foram observadas na morte celular induzida por DA ou L-DOPA. A DA induz a fragmentação do DNA na linhagem de células PC12 e células não catecolaminérgicas, como foi demonstrado pela técnica de marcação para desoxinucleotidiltransferase (TUNEL) (Offen *et al.*, 1996; Terasaka *et al.*, 2000). A L-DOPA também produz alterações morfológicas e bioquímicas, incluindo a condensação da cromatina e a fragmentação do DNA em células PC12 (Basma *et al.*, 1995; Walkinshaw e Waters, 1995). A atividade nuclear do fator de transcrição NF- κ B relacionado à apoptose foi aumentada por tratamento com DA (Lee *et al.*, 2001). A oxidação da DA também abriu o poro de transição de permeabilidade mitocondrial no encéfalo, que foi implicado na apoptose através da formação de quinonas (Berman e Hastings, 1999).

In vivo, uma demonstração clara de um efeito neurotóxico direto da DA foi fornecida por Filloux e Townsend (1993), que demonstraram que a injeção intraestriatal de DA resulta em danos pré-sinápticos e pós-sinápticos da via nigroestriatal. A morte das células neuronais que se segue à injeção de DA no estriado ocorre pela apoptose, como indicado pela presença de neurônios estriatais positivos para TUNEL com núcleos picnóticos 24 h após o tratamento com DA (Hattori *et al.*, 1998; Bozzi e Borrelli, 2006).

Apesar destes dados, o consenso, ainda que não absoluto, é de que o tratamento crônico com L-DOPA não resulta em um aumento/aceleração da perda de neurônios dopaminérgicos típica da DP. A L-DOPA poderia ser não tóxica para neurônios de DA sobreviventes, mas esta característica poderia ser modificada quando o medicamento é

administrado ao mesmo tempo em que os neurônios dopaminérgicos de pacientes com DP estão passando por degeneração. Entretanto, Ferrario *et al.* (2003) demonstraram que a L-DOPA não aumenta a degeneração retrógrada de neurônios dopaminérgicos induzidos pela administração intraestriatal de 6-OHDA, refutando esta hipótese em modelo animal.

Em células gliais, a L-DOPA/DA parece apresentar uma ação oposta a descrita, gerando um quadro de neuroproteção. Neste trabalho, vimos que a L-DOPA e a DA quando aplicadas em culturas de glia apresentaram um efeito neuroprotetor, reduzindo a ativação glial, a liberação de glutamato e a produção de algumas citocinas por essas células. De forma coerente, os níveis de LDH não foram modificados após o estímulo com L-DOPA/DA ou glutamato, indicando que as concentrações utilizadas no trabalho não levaram à toxicidade das células.

Adicionalmente, esta não é a primeira vez que a DA é descrita como possível agente protetor para células gliais. Já foi demonstrado que o estímulo de receptores dopaminérgicos em astrócitos leva ao aumento na produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator neurotrófico derivado da glia (GDNF) e fator de crescimento do nervo (NGF), todos associados à neuroproteção em modelos *in vitro* (Ohta *et al.*, 2010). Tanto a L-DOPA quanto a DA também reduzem a produção de NO em células microgliais, conforme demonstrado por Chang e Liu (2000). No nosso trabalho, é possível que o efeito protetor tanto da DA quanto da L-DOPA seja específico nas células gliais e não tenham o mesmo efeito protetor sobre os neurônios. Desta forma, o tratamento crônico com L-DOPA não influenciaria (ou até mesmo auxiliaria) nos fatores que colaboram para gerar uma resposta exacerbada dos MSNs (como o glutamato e o TNF- α), levando ao desenvolvimento da LID.

O aumento de TNF- α e outros fatores inflamatórios, como OX-42 (marcador de células microgliais), GFAP e iNOS já foi descrito no estriado de ratos tratados com L-DOPA. No estriado dorsolateral, Mulas *et al.* (2016) descreveram que a denervação de DA induziu uma resposta inflamatória caracterizada pela presença de micróglia reativa, além da imunorreatividade aumentada para TNF- α . De acordo com este e outros estudos (Barnum *et al.*, 2008; Bortolanza *et al.*, 2015a; 2015b; Mulas *et al.*, 2016), a L-DOPA exacerbou a resposta neuroinflamatória no estriado dorsolateral, a área do encéfalo envolvida principalmente no desenvolvimento da LID (Cenci *et al.*, 1998). Assim, este tratamento aumentou a microgliose e os níveis de TNF- α nesta área, bem como os níveis de iNOS e GFAP. Estes dados corroboram nossos achados, sugerindo que o TNF- α pode ter papel

fundamental no desenvolvimento da LID. Nosso trabalho também é pioneiro por mostrar que o glutamato, e não a L-DOPA/DA *per se* é responsável pelo aumento desta citocina. Entretanto, no relato de Mulas *et al.* (2016) a produção de TNF- α no estriado de animais discinéticos ocorre em células microgliais, enquanto através do modelo de cultura primária, descrevemos que o aumento desta citocina pelo glutamato ocorre especificamente pelos astrócitos.

Nossos dados sugerem que a manifestação da LID possui um componente inflamatório importante, que inclui o aumento da expressão de NF- κ B e a produção de citocinas, como o TNF- α , no estriado lesionado. Este aumento parece ser dependente especificamente da transmissão glutamatérgica sobre os astrócitos.

Drogas utilizadas na clínica em diferentes contextos, como o CBD, que apresenta ação anti-inflamatória além de ser um importante modulador da liberação de neurotransmissores como a DA e o glutamato (Booz, 2011; Burstein, 2015; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005), podem oferecer importante alternativa na terapêutica da manifestação da LID através da redução central da neuroinflamação (Dubois *et al.*, 1998; Hawkey, 1999; Hinz e Brune, 2002). Os inibidores específicos da COX-2 (enzima aumentada nos animais discinéticos conforme demonstrado no capítulo 1), anti-inflamatórios não esteroidais que possuem amplo efeito terapêutico na DP (Sánchez-Pernaute *et al.*, 2004), podem representar uma estratégia não somente para o tratamento da LID, mas também indicar se a presença desta enzima é um processo chave nesta patologia; isto é, se o surgimento da COX-2 é uma das responsáveis pela manifestação da LID.

Para responder a esta pergunta, nosso próximo objetivo foi o de verificar se os anti-inflamatórios aplicados na clínica como o CBD (princípio ativo de fármacos utilizados no tratamento para epilepsia, também com ação anti-inflamatória) e o Celec (Celebra; inibidor específico da COX-2) são eficazes na redução da LID e se eles poderiam reduzir a expressão da enzima COX-2 nesses modelos.

CAPÍTULO 3 – A AÇÃO DE ANTI-INFLAMATÓRIOS SOBRE A
DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA

PARTE 3.1 – CANABINÓIDES

PARTE 3.1 – CANABINÓIDES:

A coadministração de CBD e antagonista TRPV-1, CPZ, reduz os AIMs induzidos por L-DOPA: O tratamento crônico com L-DOPA em camundongos lesionados com 6-OHDA induziu um aumento significativo na pontuação dos AIMs axial, do membro anterior e orofacial ao longo do tempo ($X^2 (3) = 21,5$, $p < 0,05$; Material Suplementar 6A). A pontuação de AIMs no vigésimo primeiro dia foi maior que em qualquer outro dia do tratamento com L-DOPA ($p < 0,05$). Por outro lado, o comportamento rotatório contralateral induzido por L-DOPA foi desenvolvido modestamente no primeiro dia de tratamento com L-DOPA e permaneceu estável durante os 21 dias de tratamento ($X^2 (3) = 7,329$, $p > 0,05$; Material Suplementar 6B). A administração de Vei não alterou os AIMs ou o comportamento rotatório quando comparado com o tratamento com L-DOPA no dia 21 ($p > 0,05$; dados não mostrados) e foi utilizado como controle.

Após a LID estabelecida, o CBD foi testado. Três doses diferentes de CBD (15, 30 e 60 mg/kg i.p.) foram administradas 15 minutos antes da L-DOPA. O CBD não alterou os AIMs axial, do membro anterior e orofacial em comparação ao Vei/L-DOPA em nenhuma das doses administradas (AIMs: $X^2 (3) = 2,423$, $p > 0,05$; AIMs locomotores: $X^2 (3) = 4,5$, $p > 0,05$; figuras 41A e 41B, respectivamente).

Para investigar se a ativação de receptores TRPV-1 poderia ser responsável pela falta de efeito do CBD na LID (González-Aparício e Moratalla, 2014), administramos o antagonista TRPV-1, CPZ (1 e 5 mg/kg i.p.) em conjunto com Vei ou CBD (30 mg/kg i.p.) em camundongos hemiparkinsonianos antes da administração de L-DOPA. Os resultados indicaram um efeito geral de tratamento de drogas ($X^2 (5) = 34,335$, $p < 0,05$; figura 41C). Ambas as doses de CPZ administradas em conjunto com o CBD 30 mg/kg reduziram significativamente os AIMs quando comparados ao grupo Vei/L-DOPA (CPZ-1+CBD: $Z = 2,521$, $p < 0,05$; CPZ-5+CBD: $Z = 2,527$, $p < 0,05$). Os grupos Vei/L-DOPA, CPZ/L-DOPA (em ambas as doses) e CBD/L-DOPA, por sua vez, não foram estatisticamente diferentes entre si ($p > 0,05$). Isto indica que os efeitos do CBD sobre a LID só se tornam visíveis após o bloqueio prévio dos receptores TRPV-1. A coadministração de CPZ+CBD não diminuiu os AIMs locomotores em nenhuma das doses administradas ($X^2 (5) = 10,119$, $p > 0,05$; figura 41D).

A análise de curso temporal dos AIMs induzidos por L-DOPA revelou um efeito significativo nos tempos de 2-180 min após a administração deste fármaco, atingindo um pico

de efeito aos 30 min pós-tratamento sistêmico (tempo: $F(6, 42) = 96,13$, $p < 0,05$). Houve um efeito geral no fator 'tratamento' ($F(2, 14) = 13,69$, $p < 0,05$) e também uma interação significativa 'tempo x tratamento' ($F(12, 84) = 6,425$, $p < 0,05$; figura 41E). A análise pós-hoc revelou que a coadministração de CPZ+CBD previamente à L-DOPA levou a uma redução da manifestação de AIMs em todos os tempos analisados ($p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA) com exceção de 150 e 180 min, quando a manifestação dos AIMs estava próxima de zero ou virtualmente ausente. A redução da manifestação dos AIMs não foi observada no grupo CBD/L-DOPA ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA).

Analizamos também a distância total percorrida no teste de campo aberto para verificar se os efeitos anti-discinéticos do CPZ (5 mg/kg) + CBD (30 mg/kg) estariam relacionados a um possível efeito motor depressor destes compostos ou poderiam afetar os efeitos benéficos da L-DOPA. Houve um efeito robusto do tratamento na distância percorrida dos animais ($F(2, 21) = 30,45$, $p < 0,05$; figura 41F). O tratamento com L-DOPA induziu um aumento significativo da distância total percorrida, em comparação a camundongos apenas lesionados com 6-OHDA ($p < 0,05$). Mais importante, a coadministração de CPZ+CBD não afetou os efeitos terapêuticos da L-DOPA ($p > 0,05$). Efeitos similares foram encontrados no tempo de imobilidade ($F(2, 21) = 51,16$, $p < 0,05$; Material suplementar 7A) e velocidade média dos camundongos ($F(2, 21) = 31,14$, $p < 0,05$; Material suplementar 7B).

Considerando o efeito robusto de CPZ em ambas as doses quando coadministrado com o CBD, a dose de 5 mg/kg foi escolhida para experimentos posteriores. Da mesma forma, devido ao pico de ação das drogas no período de 30-90 min, a análise da curva-temporal de tratamentos com fármacos foi realizada até o tempo de 90 min.

Figura 41: Efeito individual do CBD e após a coadministração com o antagonista TRPV-1 CPZ sobre os AIMs estabelecidos por L-DOPA. (A) Os AIMs axial, do membro anterior, orofacial ou (B) os AIMs locomotores não foram afetados pela administração de três dias com CBD nas doses de 15, 30 e 60 mg/kg. (C) O CBD (30 mg/kg) foi capaz de reduzir os AIMs globais previamente estabelecidos quando administrado junto a CPZ nas doses de 1 e 5 mg/kg; a CPZ ou o CBD individualmente não reduziram os AIMs. (D) A coadministração de CPZ (1 e 5 mg/kg) e CBD (30mg/kg) não alterou os AIMs locomotores em camundongos hemiparkinsonianos. (E) A análise temporal de pontuações de AIMs mostrou que a coadministração de CPZ e CBD diminuiu a LID nos tempos de 2-120 minutos após a administração de L-DOPA. (F) A distância total percorrida por camundongos lesionados com 6-OHDA foi aumentada por L-DOPA; a coadministração de CPZ+CBD não interferiu no efeito benéfico da L-DOPA. A-E: * $p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; F: $p < 0,05$ vs. 6-OHDA (-) (A-D: Friedman seguido por Wilcoxon. Valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (traço). E: ANOVA de duas vias ou F: de uma via seguida por Bonferroni, $n = 8$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

A AA-5-HT, inibidor da FAAH e antagonista TRPV-1, reduz a LID: O CBD inibe a degradação da anandamida através da inativação da enzima responsável pela hidrólise deste endocanabinóide, FAAH (Leweke *et al.*, 2012). A anandamida é um ligante endógeno dos receptores CB₁, TRPV-1, e PPAR (Bouaboula *et al.*, 2005; O'Sullivan, 2007). Embora o CBD seja um agonista CB₁ de baixíssima afinidade, ele pode ativar os dois outros receptores (Campos *et al.*, 2012). Para testar a hipótese de que o CBD poderia agir sobre a LID aumentando os níveis de anandamida (indiretamente através da inibição da FAAH), foi realizado um experimento utilizando um inibidor específico da FAAH, AA-5-HT, que é também antagonista TRPV-1.

A AA-5-HT (5 mg/kg i.p.), na dose mais baixa para inibição da FAAH e antagonismo do receptor TRPV-1 (Maione *et al.*, 2007), diminuiu robustamente os AIMs induzidos por L-DOPA ($Z = 1,802$, $p < 0,05$; figura 42A), sem alterar os AIMs locomotores ($Z = -0,94$, $p > 0,05$, figura 42B). Os resultados são consistentes com a sugestão de que os efeitos de CPZ+CBD na LID envolvem um aumento dos níveis de anandamida e o antagonismo de receptor de TRPV-1.

Figura 42: Efeito do AA-5-HT (inibidor da FAAH e antagonista TRPV-1) sobre os AIMs estabelecidos por L-DOPA. (A) O AA-5-HT diminuiu os AIMs axial, do membro anterior e orofacial. (B) No entanto, este composto não reduziu os AIMs locomotores em camundongos hemiparkinsonianos. * $p < 0,05$ vs. Veh/L-DOPA (Wilcoxon, $n = 8$ /grupo). Valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (traço).

O antagonista seletivo do receptor CB₁, AM251, reverte a redução da LID causada pela coadministração de CPZ+CBD: O receptor CB₁ é um dos principais receptores de anandamida e tem sido descrito como um participante crítico da modulação da LID pelo sistema canabinóide (Morgese *et al.*, 2007; Rodríguez de Fonseca *et al.*, 2005). Considerando que o CBD pode aumentar os níveis de anandamida e a CPZ bloqueia a

ativação de TRPV-1 causada pelo CBD e/ou anandamida, nosso próximo passo foi verificar se os efeitos do CPZ+CBD dependem da ativação do CB₁.

O AM251, um antagonista seletivo do receptor CB₁, induziu um efeito geral nos AIMs ($X^2(3) = 18,943$, $p < 0,05$; figura 43A). Na análise pós-hoc, observamos que o AM251 sozinho não foi capaz de afetar os AIMs induzidos por L-DOPA ($Z = 1,524$, $p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA); no entanto, quando administrado juntamente a CPZ+CBD, este reverteu parcialmente a redução de LID causada por estes compostos (vs. Vei: $Z = 2,371$, $p < 0,05$; vs. CPZ+CDB +: $Z = 2,197$, $p < 0,05$).

Na análise temporal, houve efeitos gerais de tempo e de tratamento (tempo: $F(3,75) = 97,57$, $p < 0,05$; tratamento $F(3,25) = 7,967$, $p < 0,05$), sem interação entre eles (interação: $F(9,75) = 0,96$, $p > 0,05$; figura 43B). O grupo CPZ+CBD/L-DOPA apresentou uma diminuição de AIMs em comparação ao grupo Vei em todos os pontos analisados ($p < 0,05$) e o AM251 atenuou parcialmente este efeito ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA e CPZ+CBD/L-DOPA).

Além disso, foram analisados os efeitos do AM251 em cada categoria de AIMs: axial ($X^2(3) = 7,925$, $p < 0,05$; figura 43C), do membro anterior ($X^2(3) = 12,971$, $p < 0,05$; figura 43D) e orofacial ($X^2(3) = 12,627$, $p < 0,05$; figura 43E). A análise pós-hoc mostrou que a composição AM251+CPZ+CBD/L-DOPA reverteu parcialmente os AIMs em comparação ao CPZ+CBD/L-DOPA quando analisado nos AIMs do membro anterior (vs. Vei: $Z = 2,371$, $p < 0,05$; vs. CPZ+CBD: $Z = 2,032$, $p < 0,05$) e orofaciais (vs. Vei: $Z = 2,207$, $p < 0,05$, vs. CPZ+CBD: $Z = 2,213$, $p < 0,05$). No entanto, a composição não reverteu os AIMs axiais reduzidos por CPZ+CBD/L-DOPA (vs. Vei: $Z = -1,781$, $p < 0,05$; vs. CPZ + CBD: $1,355$, $p > 0,05$). Isto sugere que o receptor CB₁ está envolvido na redução da LID do membro anterior e orofacial, mas não na axial. De modo similar, os AIMs locomotores não foram afetados ($X^2(3) = 1,818$, $p > 0,05$; figura 43F).

Figura 43: Efeito do AM251 (antagonista CB₁) na redução de AIMs causada pela coadministração de CPZ+CBD. (A) O AM251 (1 mg/kg) reverteu parcialmente a redução dos AIMs globais causada pela coadministração de CPZ+CBD. (B) Na curva temporal de pontuação de AIMs, a combinação AM251+CPZ+CBD/L-DOPA não foi significativamente diferente do grupo Vei/L-DOPA ou do grupo CPZ+CBD/L-DOPA em qualquer tempo analisado. (C) O AM251 não bloqueou a redução dos AIMs axiais causada pela coadministração de CPZ+CBD. (D) O A AM251 impediu a redução dos AIMs do membro anterior e l(E) orofaciais causados pelo CPZ+CBD/L-DOPA. (F) Os AIMs locomotores não foram afetados pelo AM251. * $p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA, $\Delta p < 0,05$ vs. CPZ+CBD/L-DOPA e Vei/L-DOPA (Friedman seguido por Wilcoxon, $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (traço).

O antagonista de receptores PPAR γ , GW9662, reverte a redução da LID causada pela coadministração de CPZ+CBD: A anandamida é classicamente conhecida por ativar receptores CB₁ e TRPV-1. No entanto, este endocanabinóide foi recentemente descrito como um ligante endógeno do receptor de hormônio nuclear PPAR γ , uma família de fatores de transcrição ativados por anandamida (Bouaboula *et al*, 2005; O'Sullivan, 2007). Portanto, nosso próximo passo foi investigar se este receptor iria desempenhar um papel nos efeitos da CPZ+CBD.

O GW9662, um antagonista de PPAR γ , induziu um efeito geral significativo sobre os AIMs induzidos por L-DOPA ($X^2(3) = 18,943$, $p < 0,05$; figura 44A), mas os AIMs locomotores não foram afetados ($X^2(3) = 6,736$, $p < 0,05$; figura 44F). Na análise pós-hoc, assim como para o AM251, o GW9662 *per se* não afetou os AIMs induzidos por L-DOPA (vs. Vei: $Z = -0.847$, $p > 0,05$), mas reverteu parcialmente os efeitos de CPZ+CBD quando administrada juntamente a estes compostos (vs. Vei: $Z = 2,371$, $p < 0,05$; vs. CPZ+CBD: $Z = 2,371$, $p < 0,05$).

Na análise de curva temporal, houve efeito geral do tempo ($F(3,75) = 66,827$, $p < 0,05$) e do tratamento ($F(3,25) = 11,071$, $p < 0,05$), sem interação entre os dois ($F(9,75) = 0,136$, $p > 0,05$; figura 44B). O grupo CPZ+CBD/L-DOPA foi estatisticamente diferente do grupo Vei em todos os pontos analisados ($p < 0,05$) e a presença de GW9662 atenuou este efeito ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA e CPZ+CBD/L-DOPA).

Foram analisados os efeitos de GW9662 em cada categoria de AIMs: axial ($X^2(3) = 10,13$, $p < 0,05$; figura 44C), do membro anterior ($X^2(3) = 17,261$, $p < 0,05$; figura 44D) e orofaciais ($X^2(3) = 16,191$, $p < 0,05$; figura 44E). A combinação GW9662+CPZ+CBD/L-DOPA reverteu completamente os AIMs axiais (vs. Vei: $Z = 1,101$, $p > 0,05$; vs. CPZ+CBD: $Z = 2,201$, $p < 0,05$). No entanto, não houve efeito da combinação sobre os AIMs do membro anterior (vs. Vei: $Z = 2,366$, $p < 0,05$; vs. CPZ+CBD: $Z = -0.085$, $p > 0,05$) e orofaciais (vs. Vei: $Z = 2,207$, $p < 0,05$; vs. CPZ+CBD: $Z = -0.420$, $p > 0,05$), sugerindo um efeito diferente do AM251. Estes resultados indicam que os receptores CB₁ e PPAR agem em conjunto para reduzir a manifestação da LID.

Figura 44: Efeito do GW9662 (antagonista PPAR-gama), na redução de AIMs induzida por CPZ+CBD. (A) O GW9662 (4 mg/kg) reverteu parcialmente a redução dos AIMs causada pela coadministração de CPZ+CBD. (B) O GW9662 não foi significativamente diferente do grupo Vei/L-DOPA ou CPZ+CBD/L-DOPA em qualquer tempo analisado. (C) O GW9662 reverteu os AIMs axiais anteriormente reduzidos pela coadministração de CPZ+CBD. (D) Os AIMs do membro anterior e (E) orofaciais não foram afetados pelo pré-tratamento com GW. (F) Os AIMs locomotores não foram afetados. * $p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA, $\Delta p < 0,05$ vs. CPZ+CBD/L-DOPA e Vei/L-DOPA (Friedman seguido por Wilcoxon, $n = 7$ /grupo). Dados apresentados na forma de valores individuais (ponto) e mediana (barra).

O efeito de CPZ+CBD não ocorre devido a alterações na expressão de TH: Para garantir que os grupos experimentais apresentassem intensidade de lesão semelhante (excluindo a possibilidade de diferentes tamanhos de lesão para explicar os efeitos anti-discinéticos de CPZ+CBD) e confirmar que os efeitos anti-discinéticos não ocorreram devido a modificações na lesão dopaminérgica, os níveis de TH foram quantificados no estriado lesionado (figura 45A-45D). A redução média da TH para os grupos de animais foi de cerca de 60%.

Os dados mostraram um efeito geral da lesão para todas as áreas estriatais analisadas (medial: $F(1,40) = 48,64$, $p < 0,05$; lateral: $F(1, 82) = 183,4$, $p < 0,05$). No entanto, não houve diferença geral de tratamento, indicando que a presença de fármacos não influenciou a intensidade da lesão (medial: $F(1,40) = 0,05$, $p > 0,05$; lateral: $F(1,82) = 4,115$, $p > 0,05$). Como esperado, nenhuma interação "lesão x tratamento" foi encontrada (medial: $F(1, 40) = 1,015$, $p > 0,05$; lateral: $F(1,82) = 0,9504$, $p > 0,05$; figura 45A). Uma redução intensa das fibras TH+ pôde ser observada na análise post-hoc do lado lesionado quando comparado com o lado não lesionado ($p < 0,05$). Entre os grupos tratados com Vei ou CPZ+CBD, entretanto, nenhuma diferença na TH foi encontrada ($p > 0,05$).

Figura 45: Efeito da coadministração de CPZ+CBD em fibras TH+. (A) A análise de densidade ótica das secções estriatais medial e (B) lateral indicou que a expressão de TH no lado lesionado foi robustamente reduzida quando comparada ao lado não lesionado, mas não houve diferença entre os tratamentos com Vei e CPZ+CBD. (C-D) Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo em diferentes posições relativas ao Bregma Ilustrando a perda de fibras TH+ no estriado. * $p < 0,05$ vs. lado não lesionado (ANOVA de duas vias seguida por Bonferroni, $n = 8/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. Str: estriado; a imagem indica que os gráficos representam a análise das três secções estriatais avaliadas.

A combinação CPZ+CBD reduz a expressão de p-Ach3 e p-ERK 1/2 no estriado lesionado: Alterações na expressão de marcadores moleculares como p-ERK 1/2, p-Ach3, dinorfina B e FosB, entre outros, na área dorsolateral do estriado lesionado têm sido ligadas à manifestação da LID (Andersson *et al.*, 1999; Pavón *et al.*, 2006; Santini *et al.*, 2009). Várias drogas experimentais capazes de aliviar a LID também podem afetar a expressão destes marcadores (González-Aparicio e Moratalla; Padovan-Neto *et al.*, 2013, 2015. Martinez *et al.*, 2015). Com base nestes dados, verificamos se o CPZ+CBD modificaria a expressão de dois marcadores moleculares clássicos da LID, p-Ach3 e p-ERK 1/2.

Como esperado, houve um aumento nas células imunorreativas para p-Ach3 restrito à área lateral do estriado lesionado de camundongos tratados com L-DOPA, sem afetar significativamente o lado não lesionado (lado: $F(1, 82) = 144,4$, $p < 0,05$, dados não mostrados). O tratamento com CPZ+CBD também produziu um efeito geral sobre os níveis de p-Ach3 (tratamento: $F(1, 82) = 6,534$, $p < 0,05$). Houve uma interação significativa entre ‘lado lesionado x tratamento’ indicando que os fármacos administrados foram capazes de causar uma alteração específica no lado da lesão (interação: $F(1, 82) = 14,61$, $p < 0,05$; figuras 46A, 46B e 46D). A análise pós-hoc indicou níveis aumentados de p-Ach3 no estriado dorsolateral lesionado após o tratamento com L-DOPA ($p < 0,05$ vs. Lado não-lesionado) e o CPZ+CBD reduziu a expressão de p-Ach3 em relação ao grupo Vei ($p < 0,05$).

O estriado medial lesionado também foi afetado pelo tratamento com L-DOPA (lesão: $F(1, 40) = 17,97$, $p < 0,05$), mas não pelo pré-tratamento com CPZ+CBD (tratamento: $F(1, 40) = 2,89$, $p > 0,05$). Não houve interação entre estes dois fatores (interação: $F(1, 40) = 0,4452$, $p > 0,05$; figura 46E).

A p-ERK é uma proteína citoplasmática intermediária na ativação de diversos genes de resposta imediata, como de FosB e da própria p-Ach3. A p-ERK 1/2 também aumentou no estriado lesionado de camundongos apresentando LID em comparação a camundongos somente lesionados com 6-OHDA, como observado por análise de Western blot ($F(2,9) = 10,07$, $p < 0,05$; figuras 46F e 46G). A L-DOPA aumentou os níveis de p-ERK 1/2 em camundongos lesionados com 6-OHDA ($p < 0,05$) e o pré-tratamento com CPZ+CBD reduziu estes níveis quando comparado com animais tratados com Vei/L-DOPA ($p < 0,05$).

Figura 46: Efeito de CPZ+CBD sobre a expressão de p-Ach3 e p-ERK após o tratamento com L-DOPA. (A) A quantificação de p-Ach3 foi realizada nas áreas medial e lateral do estriado lesionado e não lesionado de camundongos discinéticos. A L-DOPA aumentou a expressão de p-Ach3 nas áreas laterais do estriado lesionado. O tratamento com CPZ+CBD/L-DOPA reduziu significativamente o número de células p-Ach3+ nesta região. A área medial do estriado não foi afetada. (B-E) Fotomicrografias mostrando as células TH+ (B e D) e pAch3 (C e E) no estriado sem DA do grupo Vei/L-DOPA (B e C) e CPZ+CBD/L-DOPA (D e E). (F) Imagens representativas de p-ERK 1/2 estriatal (44/42 kDa) e α-tubulina (50 kDa, controle). (G) A quantificação de Western Blot para p-ERK no estriado de camundongos hemiparkinsonianos demonstrou que o tratamento com L-DOPA aumentou significativamente a expressão de p-ERK, e este efeito foi revertido pela CPZ+CBD. (A: * $p < 0,05$ vs. lado não lesionado, # $p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA; ANOVA de duas vias seguido de Bonferroni, $n = 6-8$ /grupo. G: * $p < 0,05$, ANOVA de uma via seguida de Bonferroni, $n = 4$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. Str: estriado; a imagem indica que os gráficos representam a análise das três secções estriatais avaliadas (especificamente na área lateral, a não ser quando especificado).

A associação de CPZ+CBD reduz a expressão de COX-2 e NF- κ B no estriado lesionado:

Fatores não neuronais, como a inflamação, foram sugeridos como participantes importantes na LID (Barnum *et al.*, 2008; Ossola *et al.*, 2011; Bortolanza *et al.*, 2015a e 2015b). Recentemente, nosso grupo descreveu que a enzima COX-2 é expressa no lado lesionado do estriado de ratos discinéticos. Mostramos também que o 7-nitroindazol, um inibidor preferencial *in vivo* da nNOS, é uma droga anti-discinética eficaz e reduz o número de células COX-2+ no estriado lesionado (Bortolanza *et al.*, 2015b; Padovan-Neto *et al.*, 2009; 2015). Também, a COX-2 metaboliza endocanabinoides (Kim e Alger, 2004; Glaser e Kaczocha, 2010; Valdeolivas *et al.*, 2013). Com base nestes estudos, verificamos se os efeitos anti-discinéticos de CPZ+CBD poderiam modular o processo de neuroinflamação induzido pela L-DOPA existente em camundongos hemiparkinsonianos investigando a expressão de COX-2 no estriado.

O número de células de COX-2+ aumentou no estriado lesionado de camundongos parkinsonianos apresentando AIMs após o tratamento crônico com L-DOPA (lado: $F(1, 46) = 22,10$, $p < 0,05$; figura 47A), conforme esperado. A expressão de COX-2 dependeu da interação entre tratamento com L-DOPA e lado de tratamento, uma vez que a imunorreatividade foi encontrada apenas no estriado dorsolateral lesionado após tratamento com L-DOPA (interação: $F(1, 46) = 11,85$, $p < 0,05$, dados não apresentados). O pré-tratamento com CPZ+CBD reduziu o número de células COX-2+ no estriado dorsolateral quando comparado ao grupo Vei/L-DOPA (tratamento: $F(1, 46) = 11,85$, $p < 0,05$; figura 47A-47E). Houve uma correlação positiva significativa entre o número de células COX-2+ e os AIMs, isto é, o número de células COX-2+ no estriado lesionado corresponde diretamente aos níveis dos AIMs apresentados pelos camundongos (figura 47F; $R = 0,81$, $p < 0,05$).

Em seguida, avaliamos a expressão de NF- κ B pós-tratamento com CPZ+CBD ou Vei ($F(2,9) = 8,391$, $p < 0,05$; figuras 47G e 47H). A análise por Western blot indicou que a proteína NF- κ B aumentou no estriado lesionados de camundongos que apresentam LID quando comparados a animais apenas lesionados com 6-OHDA. O pré-tratamento com CPZ+CBD diminuiu os níveis da proteína NF- κ B em comparação aos animais Vei/L-DOPA ($p < 0,05$).

Figura 47: Efeito de CPZ+CBD sobre COX-2 e NF-κB no estriado lesionado de camundongos. (A) A quantificação da COX-2 no estriado discinético demonstrou que o tratamento com CPZ+CBD reduziu significativamente a expressão desta enzima. (B) Existe uma correlação positiva significativa entre expressão de COX-2 e manifestação de AIMs nos ratos hemiparkinsonianos. (C-F) Fotomicrografias representativas de células COX-2+ no estriado com depleção de DA dos grupos Vei/L-DOPA (C e D) e CPZ+CBD/L-DOPA (E e F); (B e D) ampliações das imagens anteriores. (G) Western blots representativos de NF-κB estriatal (65 kDa) e α-tubulina (50 kDa, controle). (H) A quantificação da proteína NF-κB no estriado lesionado revelou que o tratamento com L-DOPA aumentou significativamente os níveis de NF-κB, enquanto o CPZ+CBD reduziu sua expressão. IHC: * $p < 0,05$ (Student teste t, $n = 8/\text{grupo}$). WB: * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida por Bonferroni, $n = 4/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento com CPZ+CBD reduz a produção de PGE₂ no estriado lesionado de camundongos discinéticos: Inicialmente demonstramos que o pré-tratamento com CPZ+CBD reverteu a manifestação da LID. Associada a esta diminuição, houve uma redução na expressão de FosB e COX-2. Verificamos em seguida se a produção de PGE₂ no estriado de animais discinéticos também estaria diminuída após o tratamento com CPZ+CBD.

Houve um efeito geral sobre a produção de PGE₂ ($F(2, 16) = 11,94$, $p < 0,05$; figura 48). O tratamento com L-DOPA elevou a produção de PGE₂, ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA). Por outro lado, o tratamento com CPZ+CBD impediu o aumento de PGE₂ induzido pelo tratamento com L-DOPA ($p < 0,05$ vs. L-DOPA).

Figura 48: Influência do pré-tratamento com CPZ+CBD sobre a produção de PGE₂ no estriado lesionado de animais discinéticos. O tratamento de 21 dias com L-DOPA aumentou significativamente a produção de PGE₂; porém o pré-tratamento com CPZ+CBD conseguiu impedir o aumento induzido pela L-DOPA. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni; $n = 6$ /grupo). Valores (pg/ml) apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

PARTE 3.2 - INIBIDORES DE CICLOOXIGENASE

PARTE 3.2 – INIBIDORES DA CICLOOXIGENASE:

Celec e Indo, inibidores da COX, não reduzem a LID em camundongos hemiparkinsonianos: Após caracterizarmos a existência da COX-2 no estriado de camundongos hemiparkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA e observarmos uma correlação positiva entre a LID e a expressão da enzima (capítulo 1), como próximo passo decidimos avaliar se o tratamento com anti-inflamatórios seria capaz de modular a LID existente. Para isso, utilizamos o inibidor específico da COX-2, Celec (1, 5 e 10 mg/kg; Chen *et al.*, 2000) e como controle positivo, um inibidor de COX inespecífico (COX-1 e COX-2), Indo (10 mg/kg; Machado *et al.*, 2015).

O tratamento crônico com L-DOPA em camundongos lesionados com 6-OHDA induziu um aumento significativo nos escores de AIMs ao longo do tempo, conforme esperado ($F(6, 78) = 12,28, p < 0,05$). O tratamento com Celec, em uma dose capaz de diminuir a síntese de prostaglandinas no SNC de camundongos (5 mg/kg i.p.; Chen *et al.*, 2000) não reverteu a LID presente nos camundongos tratados com L-DOPA ($F(1, 14) = 0,001159, p > 0,05$), sem haver também uma interação significativa ‘tempo x tratamento’ ($F(6, 84) = 1,939, p > 0,05$; figura 49A).

Considerando que a ausência de efeito poderia se tratar de uma dose ineficaz para a inibição da síntese de prostaglandinas, também utilizamos doses de 1 mg/kg ($F(3, 24) = 0,08692, p > 0,05$; figura 49B) e 10 mg/kg ($F(3, 24) = 0,6350, p > 0,05$; figura 49C). Essas doses também não foram capazes de reduzir a manifestação de AIMs em nenhum dos cinco dias de tratamento ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA). Para descartar a possibilidade de que a LID poderia ser dependente da ativação de COX-1 em vez de COX-2, utilizamos um inibidor geral de COX, Indo (10 mg/kg i.p.; Machado *et al.*, 2015). Observamos a ausência de um efeito geral da Indo ($X^2(2) = 0,0012, p > 0,05$; figura 49D) e, assim como com o Celec, a análise pós-hoc mostrou que a Indo não reduziu a LID (dia 1: $Z = -0,631, p > 0,05$; dia 3: $Z = -0,105, p > 0,05$).

Figura 49: Efeito dos inibidores de COX Celec e Indo sobre os AIMs estabelecidos por L-DOPA. (A) Os AIMs axiais, do membro anterior e orofaciais não foram significativamente afetados pelo tratamento sub crônico com Celec 5 mg/kg em nenhum dos dias analisados. (B) A dose de 1 mg/kg ou de (C) 10 mg/kg também não foram eficazes em reduzir os AIMs induzidos por L-DOPA. (D) A Indo (10 mg/kg) não reduziu a manifestação da LID após 3 dias de tratamento. A-C: ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguido por pós-hoc de Bonferroni, $n = 8/\text{grupo}$. Dados apresentados em forma de média $\pm$ EPM. D: Friedman seguido de Wilcoxon, $n = 6/\text{grupo}$. Dados apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (traço).

O inibidor de COX-2 Celec não é capaz de alterar a expressão de FosB, COX-2 ou NF- κ B: Para garantir a homogeneidade dos grupos quanto à lesão, realizamos uma imunohistoquímica para TH. Um efeito geral do fator 'lesão' foi encontrado para o estriado (medial $F(1, 30) = 23,34$, $p < 0,05$; lateral: $F(1, 94) = 855,4$, $p < 0,05$), mas o fator 'tratamento' não foi significativo sobre a expressão de TH, indicando que o tratamento com Celec não influenciou a perda de DA nos grupos analisados (medial: $F(1, 30) = 0,01577$, $p > 0,05$; lateral: $F(1, 94) = 0,07875$, $p > 0,05$). Também não houve interação entre 'lado lesionado x tratamento' (medial: $F(1, 30) = 0,01630$, $p > 0,05$; lateral: $F(1, 94) = 0,08039$; $p > 0,05$; figura 50A). Na análise pós-hoc, uma redução intensa das fibras de imunorreativas para TH pôde ser observada do lado lesionado quando comparado ao lado não lesionado ($p < 0,05$ vs. lado não lesionado). O tratamento com Celec não alterou a expressão de TH ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA).

Avaliamos também se o tratamento com Celec poderia resultar em uma redução de fatores classicamente relacionadas à LID, como o gene de expressão imediata FosB e o fator inflamatório COX-2, apontado aqui como aumentado após o tratamento com L-DOPA. O número de células marcadas para FosB aumentou no estriado lesionado de camundongos tratados com L-DOPA em comparação ao lado não lesionado, como esperado ($F(1, 78) = 53,06$, $p < 0,05$). O aumento de FosB foi específico na região lateral do estriado, onde há maior perda dopaminérgica (ver figura 25). O tratamento com Celec, entretanto, não levou a um efeito geral sobre os níveis de FosB ($F(1, 78) = 0,0007577$, $p > 0,05$), sem interação entre os dois ($F(1, 78) = 0,001977$, $p > 0,05$; figura 50B).

O número de células de COX-2+ também aumentou especificamente no lado dorsolateral do estriado lesionado de camundongos discinéticos ($F(1, 94) = 37,97$, $p < 0,05$; dados não mostrados) enquanto o efeito geral de tratamento com Celec mais uma vez foi incapaz de alterar o número de células COX-2+ no estriado lesionado ($F(1, 94) = 0,1110$, $p > 0,05$), sem interação entre os fatores ($F(1, 94) = 0,1124$, $p > 0,05$; figura 50C). As imagens representativas da perda de TH e expressão de FosB e COX-2 estão demonstradas nas figuras 50D-50I.

Por fim, a análise de NF- κ B também foi realizada ($F(2, 9) = 17,02$, $p < 0,05$; Material Suplementar 9). Enquanto a L-DOPA aumentou consideravelmente a expressão de NF- κ B ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA), o uso de Celec não reduziu de forma significativa a expressão deste fator de transcrição ($p > 0,05$ vs. Vei/L-DOPA).

Figura 50: Análise do tratamento com Celec sobre a expressão de TH, FosB e COX-2 no estriado lesionado. (A) A lesão com 6-OHDA reduziu a expressão de TH preferencialmente na região lateral do estriado, apesar de também haver uma redução significativa no estriado medial. O tratamento com Celec (5 mg/kg) não alterou a expressão de TH. (B) A L-DOPA aumentou a expressão de FosB em áreas laterais do estriado lesionado. O tratamento com Celec/L-DOPA não modificou o aumento de células FosB+ induzido pela L-DOPA. (C) Células COX-2+ surgiram após o tratamento com L-DOPA, e o pré-tratamento com Celec não alterou o aumento de COX-2. (D-E) Fotomicrografias representativas indicando a perda de TH, (F-G) FosB e (H-I) COX-2 no estriado lesionado do grupo Vei/L-DOPA (D, F e H) e Celec/L-DOPA (E, G e I). A: * $p < 0,05$ vs. lado não lesionado; B: * $p < 0,05$ vs. Vei/L-DOPA (ANOVA de duas vias seguida por pós-hoc de Bonferroni, $n = 8/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. Str: estriado; a imagem indica que os gráficos representam a análise das três secções estriatais avaliadas (especificamente na área lateral, a não ser quando especificado).

O tratamento com Celec bloqueia a produção de PGE₂ no estriado lesionado de camundongos discinéticos: Anteriormente, encontramos que o tratamento sub crônico com Celec não modifica a manifestação da LID estabelecida ou a expressão da enzima COX-2. Por outro lado, o Celec é um inibidor competitivo da COX-2, inibe a atividade desta enzima ao ocupar o sítio ativo da ciclooxigenase, impedindo o acesso pelo ácido araquidônico, sem necessariamente afetar sua expressão (Goldenberg, 1999; Zarghi e Arfaei, 2011). Portanto, nosso próximo passo foi analisar a produção de PGE₂ no estriado de animais discinéticos.

Um efeito geral foi encontrado ($F(2, 16) = 20,02$, $p < 0,05$; figura 51). O tratamento com L-DOPA aumentou a produção de PGE₂, conforme o esperado ($p < 0,05$ vs. 6-OHDA). Surpreendentemente, o tratamento com Celec preveniu completamente o aumento de PGE₂ induzido pelo tratamento com L-DOPA ($p < 0,05$ vs. L-DOPA).

Figura 51: Influência do pré-tratamento com Celec sobre a produção de PGE₂ no estriado lesionado de animais discinéticos. O tratamento de 21 dias com L-DOPA aumentou os níveis de PGE₂ no estriado lesionado. O pré-tratamento com Celec (5 mg/kg) inibiu a produção induzida pela L-DOPA. * $p < 0,05$ vs. sham (ANOVA de uma via seguido por Bonferroni; $n = 6$ /grupo). Valores (pg/ml) apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

O tratamento com anti-inflamatórios não modifica a expressão de astrócitos e micróglia no estriado lateral lesionado de animais tratados com L-DOPA: Nosso próximo passo foi investigar se a diminuição da LID causada pelos dois principais anti-inflamatórios analisados poderia estar relacionada à expressão glial na área lateral do estriado lesionado, isto é, na área mais afetada pela lesão e com maiores alterações moleculares.

Ao analisarmos a expressão de astrócitos, observamos que não houve uma diferença geral significativa induzida pelo pré-tratamento com CPZ+CBD ou Celec sobre a expressão de células GFAP+ nas três regiões estriatais (aqui unificadas para representação; $F(3, 28) = 0,3254$; $p > 0,05$). Da mesma forma, a análise de Iba-1 para quantificação de micróglia, demonstrou que o tratamento sub crônico com os anti-inflamatórios não alterou a expressão

de micróglia no estriado lesionado ($F(3, 28) = 0,5851$; $p > 0,05$). A quantificação da expressão de GFAP e Iba-1 nos grupos tratados com anti-inflamatórios (ou veículo) está demonstrada na tabela 2.

	Vei/L-DOPA	Celec/L-DOPA	CPZ+CBD/L-DOPA
Astrócito (GFAP)	4,549 E+06 ± 3,367 E+05	4,222 E+06 ± 3,658 E+05	4,525 E+06 ± 3,486 E+05
Microglia (IBA-1)	3,029 E+06 ± 1,784 E+05	2,645 E+06 ± 2,744 E+05	2,917 E+06 ± 1,742 E+05

Tabela 3: Expressão de GFAP e Iba-1 no estriado lateral lesionado após o tratamento com Celec e CPZ+CBD em camundongos previamente tratados com L-DOPA. O pré-tratamento sub crônico com anti-inflamatórios não reduziu a expressão de astrócitos (GFAP) ou de micróglia (Iba-1) na área lateral do estriado lesionado de camundongos discinéticos (onde houve aumento de astrócitos causado pelo tratamento com L-DOPA). ANOVA de uma via seguido por Bonferroni; $n = 8$ /grupo. Valores apresentados em forma de média ± EPM.

DISCUSSÃO – Capítulo 3

Uma vez demonstrado que a produção de fatores inflamatórios, como o NF- κ B e a COX-2 são produzidos no estriado de animais discinéticos, e que a ativação de células gliais pelo glutamato podem estar envolvidos na LID através da produção de citocinas (Barnum *et al.*, 2008; Bortolanza *et al.*, 2015a; 2015b; Mulas *et al.*, 2016), nesta parte do trabalho tivemos como objetivo demonstrar se o tratamento de animais previamente discinéticos com fármacos anti-inflamatórios seria capaz de reduzir a manifestação da LID.

Na primeira seção deste capítulo, vimos que (i) o CBD sozinho não foi efetivo na redução da LID, mas (ii) reduziu os AIMs induzidos por L-DOPA quando administrado juntamente ao CPZ, sem (iii) afetar a atividade locomotora dos animais. O nosso achado anterior (ii) foi corroborado pela (iv) ação do AA-5-HT, um fármaco que é simultaneamente antagonista dos receptores TRPV-1 e inibidor da enzima FAAH (potencialmente aumentando os níveis de anandamida). (v) O bloqueio do receptor CB₁ ou PPAR γ reverteu seletivamente o efeito de CPZ+CBD. A análise molecular revelou que a LID foi associada ao (vi) aumento da expressão no estriado lesionado de marcadores clássicos e neuroinflamatórios de LID, p-ERK1/2, pAcH3, COX-2, NF- κ B e PGE₂, respectivamente. Finalmente, (vii) o pré-tratamento com CPZ+CBD reduziu a expressão desses marcadores, concomitante à atenuação da LID.

Na segunda parte, ao utilizarmos inibidores específicos da COX, mostramos que: (viii) três doses do inibidor seletivo da COX-2 Celec não reduziram a manifestação de AIMs em camundongos, resultado similar à (ix) Indo, inibidor das duas isoformas da COX, também incapaz de diminuir a LID. Ainda nesta linha de raciocínio, (x) o tratamento com Celec (5 mg/kg) foi incapaz de alterar tanto a expressão de COX-2 quanto de FosB, mas reduziu significativamente a produção de PGE₂.

Canabinóides:

A planta *Cannabis sativa* contém mais de 100 compostos chamados de canabinóides, incluindo o CBD, seu principal constituinte fitocanabinoide não psicoativo (Mechoulam *et al.*, 2007). Ensaio pré-clínicos e clínicos revelaram que o CBD apresenta uma ampla gama de propriedades terapêuticas, incluindo antipsicótica, analgésica, neuroprotetora, anticonvulsivante, antiemética, sedativa, antioxidante e anti-inflamatória, entre outras (para revisão, Campos *et al.*, 2012; Devinsky *et al.*, 2014; Izzo *et al.*, 2009; Marco *et al.*, 2011; Mechoulam *et al.*, 2007; Pedrazzi *et al.*, 2015; Robson, 2011).

A ação farmacológica do CBD envolve a inibição da degradação do endocanabinoide anandamida através da inativação da enzima responsável por sua hidrólise, a FAAH, entre outros efeitos (Campos *et al.*, 2012; Mechoulam *et al.*, 2007; Leweke *et al.*, 2012). A anandamida é um ligante endógeno dos receptores CB₁ e CB₂. Além disso, ela pode ativar os receptores TRPV-1 e receptores PPAR γ (Bouaboula *et al.*, 2005; O'Sullivan, 2007), sendo estes dois últimos efeitos compartilhados com o CBD (Campos *et al.*, 2012). Uma questão importante levantada no capítulo 3 foi se o CBD, descrito como um composto fitocanabinoide capaz de agir através de diferentes vias (Devinsky *et al.*, 2014), poderia aliviar a LID. Nossos resultados demonstraram que o CBD, quando administrado sozinho, não levou a uma diminuição da LID. Por outro lado, em nosso modelo experimental, o uso do antagonista de TRPV-1, CPZ, revelou o efeito anti-discinético do CBD.

Poucos estudos investigam o possível efeito do CBD em modelos pré-clínicos de LID. Os poucos ensaios clínicos que examinaram os efeitos da *Cannabis*/canabinóides em disfunções motoras associadas à DP (como a LID) produziram resultados conflitantes (Carroll *et al.*, 2004; Sieradzan *et al.*, 2001; Chagas *et al.*, 2014). Em pacientes com DP, o uso da *Cannabis* mitigou a LID em 14% dos pacientes (Venderova *et al.*, 2004). No entanto, um ensaio clínico randomizado demonstrou que o extrato de *Cannabis* quando administrado via oral foi ineficaz para aliviar os sintomas da doença ou a LID em pacientes com DP (Carroll *et al.*, 2004). Chagas *et al.* (2014) utilizaram várias doses de CBD para tratar pacientes com DP ao longo de 6 semanas, mas não conseguiram encontrar nenhuma alteração no escore motor. Em dois pacientes com distonia e características parkinsonianas, o CBD em altas doses teve efeitos agravantes distônicos e parkinsonianos (Uribe-Roca *et al.*, 2005). Entretanto, o status da LID dos pacientes com DP não foi mencionado em nenhum desses dois estudos.

CBD e o bloqueio do receptor TRPV-1: O efeito antagonista no receptor TRPV-1 pela CPZ foi crucial para revelar a ação anti-discinética induzida pelo CBD, uma vez que tanto o CBD quanto a CPZ isoladamente não reverteram a LID. Entretanto, a CPZ em duas doses diferentes revelou um efeito anti-discinético do CBD nos AIMs. Uma hipótese para explicar a falta de efeito do CBD é que a ativação de TRPV-1 pelo CBD e/ou pela anandamida (indiretamente aumentada pelo CBD através da inibição de FAAH) bloqueia os efeitos benéficos que seriam mediados por outros mecanismos, como a ativação dos receptores CB₁ e PPAR γ . Corroborando esta hipótese, Morgese *et al.* (2007) demonstraram que a inibição seletiva da FAAH pelo composto URB597 não alterou a LID, mas reduziu-a fortemente quando administrado com o antagonista de TRPV-1 CPZ. Além disso, no presente estudo,

demonstramos que a administração de um concomitante inibidor da FAAH e antagonista de TRPV-1 (AA-5-HT) também reduziram a LID, corroborando ainda mais esta hipótese.

Uma interação fisiológica entre os receptores CB₁ e TRPV-1 que apoia nossos achados foi apresentada anteriormente. No hipocampo, a ativação dos receptores CB₁ e TRPV-1 produz efeitos adversos nas neurotransmissões excitatórias e inibitórias em neurônios e interneurônios, respectivamente (Cristino *et al.*, 2006). Além disso, a estimulação de CB₁ e TRPV-1 provoca efeitos adversos nas concentrações intracelulares de cálcio (Szallasi e Di Marzo, 2000). Acredita-se que uma modulação mútua dos receptores CB₁ e TRPV-1 ocorre quando são co-expressas na mesma célula ou em uma interação estreita neurônio-neurônio/neurônio-glia (Cristino *et al.*, 2006; Hermann *et al.*, 2003 Marinelli *et al.*, 2003, Casarotto *et al.*, 2012).

Existem dados contraditórios na literatura sobre os efeitos dos antagonistas de TRPV-1 quando administrados sozinhos na LID, com descrições positivas (Gonzalez-Aparício e Moratalla, 2014) ou sem efeito significativo (Morgese *et al.*, 2007). Estes resultados distintos, no entanto, podem ser explicados por diferenças metodológicas: González-Aparício e Moratalla (2014) reduziram a LID, bloqueando seu desenvolvimento durante o tratamento com L-DOPA, enquanto no trabalho de Morgese *et al.* (2007), os animais já apresentavam a LID estabelecida antes da tentativa de reduzir sua manifestação. Além disso, em vez de CPZ, González-Aparício e Moratalla (2014) empregaram oleoiletanolamida. Este composto, além de bloquear os receptores TRPV-1, também ativa o receptor PPAR α e o receptor órfão GPR119 (Overton *et al.*, 2006). Curiosamente, os efeitos anti-discinéticos da oleoiletanolamida foram prevenidos por coadministração de capsaicina, um agonista de TRPV-1. Estes achados sugerem que o bloqueio dos receptores TRPV-1, de forma semelhante aos nossos resultados, é realmente necessário (mas talvez não suficiente) para a ação anti-discinética desse medicamento.

Os efeitos anti-discinéticos causados pela CPZ + CBD não estão relacionados a uma diminuição global da atividade locomotora. Enquanto os animais controle apresentaram hipocinesia severa (analisada através da distância total percorrida, tempo de imobilidade e velocidade média), o nível de atividade locomotora dos animais tratados com CPZ+CBD foi semelhante ao dos animais tratados com Vei/L-DOPA, cujo tratamento melhorou substancialmente a atividade locomotora dos animais parkinsonianos. Estes dados indicam

que CPZ+CBD são moduladores potentes da LID, mas não afetam o efeito motor benéfico da L-DOPA.

Envolvimento de anandamida e dos receptores CB₁/PPAR γ na manifestação da LID:

Uma ação proposta do CBD é aumentar o tônus endocanabinóide pelo aumento dos níveis de anandamida, através da inibição da enzima FAAH. Aumentar os níveis da anandamida pode ser uma maneira promissora de aliviar a LID, embora existam evidências divergentes sobre o assunto. Um estudo recente que mediu os níveis de anandamida no LCR encontrou níveis diminuídos de anandamida em pacientes com DP tratados com L-DOPA ou agonistas dopaminérgicos em comparação a pacientes de DP em período de ausência de tratamento (Pisani *et al.*, 2010). Infelizmente, o status discinético ou o momento da última administração de medicamentos não foi mencionado no estudo.

A anandamida pode se ligar/ativar uma grande família de receptores, incluindo CB₁, TRPV-1 (Campos *et al.*, 2012) e PPAR γ (Bisogno *et al.*, 2001; Devinsky *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2013; Laprairie *et al.*, 2015). Consequentemente, a ação benéfica do CBD na LID (quando coadministrada com CPZ) pode estar relacionada à ativação de receptores CB₁ ou PPAR γ (Campos *et al.*, 2012; Di Marzo *et al.*, 2002).

Os dois receptores foram previamente associados à LID (Bouaboula *et al.*, 2005; Caterina *et al.*, 1997; Di Marzo *et al.*, 2002; González-Aparicio e Moratalla, 2014; Martinez *et al.*, 2015; Morgese *et al.*, 2007; O'Sullivan, 2007; Pertwee *et al.*, 2002; Ross, 2003). O agonista CB nabilone pode reduzir a LID, conforme demonstrado em modelos animais e ensaios clínicos. Em um estudo cruzado duplo-cego, os pacientes com DP apresentaram redução da LID sem agravamento dos sinais motores parkinsonianos quando administrados oralmente com nabilone (Sieradzan *et al.*, 2001). Pequenas doses de HU-210, um potente agonista CB₁ sintético, reduziram marcadamente as rotações contralaterais induzidas por L-DOPA e apomorfina em ratos com lesão unilateral da via nigroestriatal (Gilgun-Sherki *et al.*, 2003). Além disso, a administração crônica de L-DOPA aumentou os níveis de RNAm de CB₁ no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA (Zeng *et al.*, 1999).

Ao longo da última década, alguns estudos demonstraram que os canabinóides podem interagir com receptores nucleares PPAR. O PPAR γ é expresso em micróglia, neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (Bernardo e Minghetti, 2008; Bernardo *et al.*, 2000; Moreno *et al.*, 2004). Ele regula a transcrição de genes alvo principalmente envolvidos no metabolismo, homeostase de energia, diferenciação celular e inflamação. Interessantemente, foi

demonstrado que a ativação de PPAR γ diminui a inflamação associada a insultos neurológicos crônicos e agudos (Kapadia *et al.*, 2008). Embora menos investigados que o CB $_1$, os receptores de PPAR também estão associados a propriedades neuroprotetoras em vários distúrbios neurológicos, incluindo a DP e a LID (Barbiero *et al.*, 2014a; 2014b; Breidert *et al.*, 2002; Carta *et al.*, 2011; Gillespie *et al.*, 2011; González-Aparicio e Moratalla, 2014; Martin *et al.*, 2012; Martinez *et al.*, 2015). Nos AIMs induzidos por L-DOPA em ratos, houve aumento nas vias de sinalização endocanabinóide dependente de PPAR no estriado lesionado (Wang *et al.*, 2014) e a ativação direta de PPAR γ pelo agonista rosiglitazona mitigou a LID (Martinez *et al.*, 2015).

Neste trabalho, analisamos os efeitos dos antagonistas dos receptores CB $_1$ (AM251) e PPAR γ (GW9662) no LID. O antagonista de CB $_1$ AM251 reverteu os efeitos anti-discinéticos de CPZ+CBD nas categorias da LID do membro anterior e orofacial, sem afetar os AIMs axiais. Em contraste, o antagonista de PPAR γ GW9662 reverteu apenas o efeito anti-discinético de CPZ+CBD nos AIMs axiais. Esta é a primeira vez que um efeito complementar/seletivo dos receptores CB $_1$ e PPAR γ foi descrito em sintomas específicos de AIMs, embora uma interação recíproca entre esses receptores tenha sido discutida antes (Citraro *et al.*, 2013; Fakhfour *et al.*, 2012; Payandemehr *et al.*, 2015). Interessantemente, enquanto o receptor CB $_1$ está descrito como importante no controle da liberação pré-sináptica de neurotransmissores, o receptor PPAR γ tem ampla descrição no envolvimento com respostas anti-inflamatórias. A participação conjunta e complementar destes dois receptores sugere que o efeito do CBD na LID pode ocorrer de maneira ampla, envolvendo a regulação da liberação desregulada de DA e glutamato, além de diminuir a resposta inflamatória ocorrendo no estriado de animais discinéticos.

Genes de resposta imediata, neuroinflamação e LID: O sistema canabinóide pode interagir com a transmissão de DA e glutamato no estriado e influenciar processos neurobiológicos relacionados a estes neurotransmissores, incluindo disfunções motoras (Brown *et al.*, 2003; Fernández-Ruiz, 2009; Gerdeman e Lovinger, 2001). Além disso, os endocanabinóides exercem um papel na transmissão sináptica e na plasticidade no circuito dos núcleos da base (Melis *et al.*, 2006; Sagredo *et al.*, 2007). A enorme co-expressão de receptores canabinóides e dopaminérgicos nos núcleos da base indica que o sistema endocanabinóide, incluindo o CBD (Gomes *et al.*, 2013; Walsh *et al.*, 2010), pode desempenhar um papel importante no controle do movimento voluntário na DP (Di Marzo *et al.*, 1998; Di Marzo *et al.*, 2000, Gilgun-Sherki *et al.*, 2003, Maneuf *et al.*, 1997, Meschler *et al.*, 1998).

al., 2001; Sañudo-Peña *et al.*, 1998), provavelmente devido à sua capacidade de regular o circuito dopaminérgico na via nigroestriatal (El Manira e Kyriakatos, 2010; Fernández-Ruiz, 2009; Fitzgerald *et al.*, 2012; Giuffrida *et al.*, 1999).

Como descrito anteriormente, a LID pode resultar de uma estimulação elevada e intermitente dos receptores de DA estriatal, causando mudanças persistentes na expressão de genes e proteínas, como FosB, p-Ach3, p-ERK 1/2, entre outros (Cenci *et al.*, 1998; Konradi *et al.*, 2004, para revisão, Cenci e Lundblad, 2006; Huot *et al.*, 2013). Apoiando essa visão, encontramos um aumento estriatal de p-ERK 1/2 e de p-Ach3 pelo tratamento com L-DOPA. Além disso, esses efeitos também foram impedidos pela coadministração de CBD+CPZ.

Entretanto, a neuroinflamação pode ser um importante processo pelo qual o sistema canabinóide pode regular a LID. Os receptores CB₁ e PPAR γ foram descritos como importantes alvos moduladores da inflamação no SNC (para revisão, Ashton, 2007 e O'Sullivan, 2007). Uma das principais funções dos receptores PPAR é a supressão das vias inflamatórias pela repressão de fatores de transcrição, como o NF- κ B (Barish, 2006). Breidert *et al.* (2002) utilizando um modelo experimental da DP com MPTP, demonstrou que a administração oral de pioglitazona, um agonista PPAR γ , suprimiu a morte celular dopaminérgica, a ativação microglial e a produção de mediadores pró-inflamatórios através da inibição da translocação da subunidade NF- κ B p65 ao núcleo em neurônios dopaminérgicos, células microgliais e astrócitos. A rosiglitazona (agonista PPAR γ) restaurou os níveis de fenótipo anti-inflamatório da micróglia e inibiu a expressão de fenótipo inflamatório da micróglia, juntamente com a modulação de citocinas pró-inflamatórias em um modelo de rato da DP (Pisanu *et al.*, 2014). Du *et al.* (2011) indicaram que a expressão de COX-2 e a fosforilação de NF- κ B são moduladas por PPAR γ em neurônios de hipocampo de rato em cultura.

Panikashvili *et al.* (2005) relataram que o mecanismo neuroprotetor de CB₁ após lesão cerebral traumática ocorre por inibição da translocação de NF- κ B, que está diretamente associada à atividade da COX-2 (Gasparini e Feldmann, 2012; Tanabe e Tohnai, 2002). Os receptores CB₁ são regulados nas células do SNC em resposta a lesões e/ou inflamações juntamente aos níveis de anandamida, que são aumentados após danos neuronais em diferentes situações patológicas (Di Filippo *et al.*, 2008; Sagredo *et al.*, 2007). Estes resultados sugerem que os canabinóides têm potenciais efeitos neuroprotetores na LID, controlando os processos inflamatórios. Corroborando esta hipótese, já foi descrito que a

ativação tanto de CB₁ e PPAR γ resultam na inibição da produção de citocinas em modelos *in vitro* e *in vivo* (Rockwell *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2000). Portanto, o envolvimento seletivo dos receptores CB₁ e PPAR γ na manifestação da LID pode estar ligado à inibição de marcadores pró-inflamatórios descritos na LID e encontrados neste trabalho (Barnum *et al.*, 2008; Bortolanza *et al.*, 2015a; 2015b; Mulas *et al.*, 2016; Ossola *et al.*, 2011).

Os níveis dos marcadores pró-inflamatórios COX-2 e NF- κ B aumentaram em animais discinéticos após tratamento crônico com L-DOPA e foram reduzidos após o tratamento com CPZ+CBD. Este dado reforça a ideia de que a ação conjunta destes compostos pode afetar a LID através da redução da neuroinflamação. As propriedades anti-inflamatórias do CBD foram associadas aos seus efeitos terapêuticos em vários distúrbios neuropsiquiátricos (para revisão, Campos *et al.*, 2016). Infelizmente, ainda não se sabe se a inibição de citocinas pela ação do CBD também ocorre na LID, o que corroboraria a ideia de que fatores inflamatórios clássicos podem ser importantes contribuintes na manifestação desta patologia.

Uma função alternativa de ligantes canabinóides é a de impedir a LTP, por reduzir a transmissão excitatória no hipocampo de ratos (Slanina e Schweitzer, 2005). Em seu outro estudo, o grupo demonstra que os níveis de endocanabinóides regulados pela COX-2 diminuem tonicamente a transmissão excitatória basal, via ativação de receptor CB₁. Desta forma, foi concluído que a COX-2 regula a formação de ligantes de CB₁, que regulam negativamente a formação de LTP (Slanina *et al.*, 2005). Desta forma, a diminuição de COX-2 pelo CBD pode estar relacionada à diminuição da atividade excitatória no estriado e consequente regulação da LTP estriatal.

Portanto, nossos dados confirmam a importância da neuroinflamação na LID e que drogas anti-inflamatórias podem compor uma terapêutica em potencial para esta patologia. Entretanto, estes dados não confirmam se a enzima COX-2, que se manifesta de forma concomitante ao desenvolvimento da LID, é responsável pela manifestação desta patologia, ou em vez disso, sua consequência. Desta forma, tornou-se necessário utilizar uma ferramenta farmacológica que impedisse especificamente a atividade desta enzima, como os anti-inflamatórios não esteroidais.

Inibidores de COX:

Recentemente, fatores não-neuronais, como a inflamação, têm sido sugeridos como participantes da LID (Barnum *et al.*, 2008; Bortolanza *et al.*, 2015a; Del Bel *et al.*, 2016;

Carta *et al.*, 2016; Mulas *et al.*, 2016). Os efeitos anti-discinéticos do tratamento com anti-inflamatórios endógenos como a corticosterona (Barnum *et al.*, 2008) ou exógenos, como o BN82451 (uma molécula multifuncional com atividade anti-inflamatória; Spinnewyn *et al.*, 2011), juntamente aos resultados encontrados neste trabalho suportam esta hipótese. Adicionalmente, há evidências de uma expressão aumentada de marcadores inflamatórios *in vivo* em pacientes com DP e em modelos animais tratados com L-DOPA (Bartels e Leenders, 2007; Bortolanza *et al.*, 2015a; Muñoz *et al.*, 2014; Spinnewyn *et al.*, 2011).

Nosso grupo descreveu recentemente que o tratamento prolongado com L-DOPA em animais parkinsonianos resulta no aparecimento da enzima COX-2 no estriado lesionado de ratos e que drogas que atenuam a manifestação da LID estão associadas à redução desta enzima (Bortolanza *et al.*, 2015b). Aqui, confirmamos o surgimento da COX-2 no estriado de camundongos parkinsonianos ao longo do tratamento com L-DOPA especificamente na área lesionada do estriado. Este aumento está diretamente relacionado ao tempo de tratamento com L-DOPA/intensidade de LID manifestada (ver figura 27). Neste capítulo, tivemos como objetivo utilizar inibidores da COX para verificar se a inibição farmacológica desta enzima seria capaz de reverter a LID previamente estabelecida. Nossos resultados indicaram que o tratamento com as duas drogas testadas, Celec e Indo, não geraram qualquer alteração nos AIMS induzidos por L-DOPA. Estes resultados diferem dos anti-inflamatórios inespecíficos utilizados anteriormente, CPZ+CBD.

O uso do inibidor não seletivo de COX-2 ibuprofeno diminuiu o risco para desenvolvimento da DP (Gao *et al.*, 2011). A inibição da COX-2 por ácido acetilsalicílico e salicilato proporcionou neuroproteção no modelo MPTP (Aubin *et al.*, 1998; Teismann e Ferger, 2001). Usando camundongos *knockout* para COX-2, foi confirmado o importante papel da COX-2 no modelo MPTP, já que esses camundongos apresentaram proteção significativa contra a neurodegeneração induzida por MPTP (Feng *et al.*, 2002; Teismann *et al.*, 2003). A importância da COX-2 em modelos de 6-OHDA também já foi demonstrada (Feng *et al.*, 2003; Hunot *et al.*, 2004; Sánchez-Pernaute *et al.*, 2004). O Celec também possui resultados positivos no parkinsonismo. O tratamento com esta droga reverteu o quadro de estresse oxidativo induzido por neurotoxinas e déficits motores apresentados pelo modelo, como a catatonía (Gupta *et al.*, 2009).

Aqui, semelhante ao descrito por Bortolanza *et al.* (2015b) não encontramos um aumento de COX-2 significativo induzido pela lesão com 6-OHDA no estriado. Porém, o

tratamento crônico com L-DOPA levou a um aumento significativo de COX-2, corroborando os dados descritos previamente pelo grupo. Demonstramos uma correlação entre a expressão neuronal de COX-2 no estriado lesionado e a gravidade da LID induzida por L-DOPA (Bortolanza *et al.*, 2015b). Mais importante, vimos que o tratamento com dois anti-inflamatórios não esteroidais, o Celec (inibidor específico da COX-2) e a Indo (inibidor reversível de COX-1 e COX-2) não diminuíram a manifestação de AIMs induzidos por L-DOPA ou a expressão desta enzima no estriado.

Dois aspectos importantes devem ser levados em consideração. Primeiro, um baixo nível de expressão de COX-2 pode ser encontrado no SNC (Zidar *et al.*, 2009), com expressão nula no estriado. No hipocampo, onde a COX-2 é expressa constitutivamente, ela tem por função contribuir para funções cerebrais fundamentais, como atividade sináptica, consolidação de memória e formação de LTP/alteração sináptica dependente de estímulo. Em geral, esta enzima é expressa como resposta a uma ampla gama de estímulos. No SNC, essa expressão ocorre em particular após em resposta à atividade sináptica dependente de NMDA (Yamagata *et al.*, 1993). Nas regiões onde a COX-2 é expressa em condições normais, ela tem por função contribuir para funções cerebrais fundamentais, como atividade sináptica, consolidação de memória e formação de LTP/alteração sináptica dependente de estímulo. Em segundo lugar, a "neuroinflamação" é uma reação muito mais controlada do que a inflamação nos tecidos periféricos, e em muitos casos é desencadeada e sustentada pela ativação de células residentes, particularmente células gliais (Minghetti, 2004).

O tratamento com anti-inflamatórios não esteroidais não foi capaz de inibir a manifestação da LID. A eficácia das doses utilizadas neste trabalho para inibir a atividade enzimática desta proteína já foi testada (Chen *et al.*, 2000; Hu *et al.*, 2004), o que confirma que a ausência de efeito não está relacionada à eficácia das drogas. Desta forma, a expressão de COX-2 no estriado lesionado pode não estar relacionada a uma ação neuroinflamatória que ocorreria na LID. De forma coerente, a diminuição de fatores de transcrição/proteínas associadas a esta disfunção motora também não foram afetadas, como o gene de resposta imediata FosB, e o fator de transcrição NF- κ B. Ao longo deste trabalho, descrevemos que o tratamento com L-DOPA/manifestação da LID está relacionada ao aumento da produção do agente pró-inflamatório NF- κ B, e que os inibidores da COX não reduziram a LID e também não afetaram a síntese deste fator de transcrição. O tratamento com anti-inflamatórios capazes de diminuir a LID resultaram também em níveis reduzidos desse fator, diferindo do

tratamento com Celec. Este dado reforça a hipótese de que a ação de anti-inflamatórios na redução da LID não depende diretamente da inativação da atividade enzimática da COX-2.

Baseado nos dados encontrados neste trabalho, nossa hipótese é de que o surgimento de COX-2 no estriado lesionado de animais apresentando LID seja um epifenômeno, consequência da ativação constante e irregular de outros fatores responsáveis pelo surgimento desta patologia. A transmissão de neurotransmissores envolvidos na patologia, como a DA e o glutamato, juntamente à expressão de proteínas relacionadas à atividade aberrante dos neurônios pós-sinápticos, como p-ERK 1/2, FosB, p-Ach3 (Jenner, 2008b; Francardo e Cenci, 2008) e à ativação de agentes inflamogênicos complementares que observamos em nosso e outros trabalhos (como o NF- κ B, iNOS, citocinas TNF- α e IL-1 β , além da ativação astrocitária e microglial; Barnum *et al.*, 2008; Bortolanza *et al.*, 2015a; Mulas *et al.*, 2016) levariam a modificações na atividade sináptica estriatal irregular responsável pela LID. A COX-2 acompanharia essa atividade sináptica alterada responsável pela origem da LID. Portanto, o uso de inibidores de COX-2 neste contexto não seria eficiente para mitigar a LID.

Conforme já descrito, a COX-2 é expressa em um grupo de neurônios como um gene de resposta imediata (Xie *et al.*, 1991; Yamagata *et al.* 1993). Proteínas/quinasas classicamente envolvidas com a LID, como a p-ERK 1/2 e as enzimas de síntese do NO – todas ativadas pela neurotransmissão glutamatérgica e, indiretamente, pela dopaminérgica – também são responsáveis pela síntese de genes de resposta imediata associados a esta patologia, incluindo a isoforma induzível da COX. A função exata da COX-2 como gene de resposta imediata ativada por estímulo não está completamente caracterizada (Loftin *et al.*, 2002). No estriado, ainda não existem descrições de COX-2 como indutor de modulação sináptica.

A entrada de inputs dopaminérgicos para o estriado controla processos importantes, como a formação de LTP e LTD, e são responsáveis pela manutenção da memória motora no estriado (Lovinger, 2010). Entretanto, a degeneração dopaminérgica suprime a plasticidade corticoestriatal fisiológica através da produção de alterações bioquímicas e morfológicas no do estriado. Este quadro, associado ao tratamento crônico com L-DOPA, e consequentemente ao aumento de uma transmissão dopaminérgica e glutamatérgica aberrante, resultaria em uma LTP "patológica", dependendo da ativação dos receptores NMDA localizados nos MSNs, que poderia desempenhar um papel na geração da LID (Calabresi *et al.*, 2015). Nossa hipótese é de que o surgimento da COX-2 seja parte importante nesta regulação da plasticidade neural já

descrita nesta patologia. Porém, esta função da COX-2, uma vez que a LID esteja estabelecida, não afetaria a manifestação de AIMs decorrente do tratamento prolongado com L-DOPA. Neste contexto, ela seria um produto da ativação glutamatérgica e atuaria na modulação da atividade sináptica crônica que ocorre ao longo do tratamento com L-DOPA.

Fortalecendo esta hipótese, a p-ERK também é capaz de alcançar o núcleo e levar a expressão gênica de COX-2 em diversos modelos experimentais (Chae *et al.*, 2004; Elder *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2015), atuando também na formação de LTP. A ERK é uma serina/treonina quinase ativada pela ativação de D1R e NMDA, cuja fosforilação é um pré-requisito para a indução de LTP (English e Sweatt, 1997; Coogan *et al.*, 1999). A fosforilação dependente de NMDA da ERK pode se comunicar a jusante para o fator de transcrição de genes de resposta imediata, como o c-FOS, FosB e COX-2, resultando em aumento da expressão gênica. Este caminho foi associado ao desenvolvimento do LTP do hipocampo (Davis e Laroche, 1998) (figura 52).

A produção de NO, neurotransmissor dependente da ativação glutamatérgica no estriado e de grande importância na LID (Bortolanza *et al.*, 2015a; 2015b; Padovan-Neto, 2009; 2011; 2013; 2015; Solís *et al.*, 2015) também é capaz de elevar os níveis de COX-2. Uma interação recíproca do NO/COX-2 em células normais e em células desenvolvendo processo inflamatório já foram descritas. A nNOS produz baixos níveis de NO em condições fisiológicas (nM) que, em baixa concentração, inibe a atividade do NF- κ B, consequentemente impedindo a síntese de diversos fatores pró-inflamatórios, inclusive a COX. Em células afetadas por estímulos inflamatórios, a síntese de NO encontra-se elevada (μ M) e passa então a se tornar altamente reativa e produzir peroxinitrito (ONOO). O ONOO possui ação estimulatória sobre o NF- κ B, consequentemente aumentando a expressão de COX-2 (Mollace *et al.*, 2005; Ndengele *et al.*, 2008).

Figura 52: Possíveis mecanismos de síntese de COX-2 como gene de resposta imediata/modulador da atividade neuronal a longo prazo. O tratamento prolongado com L-DOPA, ao induzir o aumento de DA e da sinalização glutamatérgica corticoestriatal, levaria ao aumento da atividade de cascatas de sinalização, como a fosforilação de ERK 1/2 (e produção de NO, não demonstrado), capaz de se translocar ao núcleo e ativar a síntese de genes de resposta imediata, como o FosB e também a COX-2. O NF- κ B, também elevado após o tratamento com L-DOPA, possui sítio de ativação para o início da síntese de genes de resposta imediata, como a COX-2 (circulado em vermelho). Nestas condições, a síntese de COX-2 pode não estar diretamente envolvida na geração de uma resposta neuroinflamatória. Retirado de Del Bel, 2012. Modificado por dos-Santos-Pereira, 2017.

As prostaglandinas, que são mediadores críticos de processos fisiológicos e inflamação, também podem ser fatores relevantes na alteração da plasticidade neural que ocorre na LID. Estas proteínas normalmente são produzidas em grande parte pela micróglia ativada e astrócitos reativos durante a neuroinflamação (Tzeng *et al.*, 2005). Inclusive, um segundo caminho pelo qual a COX-2 possivelmente leva à morte celular após a administração de MPTP é aumentando os níveis de PGE_2 . Entretanto, sua participação na formação de LTP em neurônios do hipocampo já foi constatada. O ibuprofeno é capaz de bloquear a formação de LTP em modelos *in vivo* (Shaw *et al.*, 2003), enquanto os inibidores seletivos de COX-2 bloqueiam a formação de LTP *in vitro*, sendo que esta inibição é revertida pela administração exógena de PGE_2 (Chen *et al.*, 2002).

No nosso trabalho, encontramos um aumento na produção de PGE_2 no estriado dorsolateral lesionado de camundongos tratados cronicamente com L-DOPA. Mais importante, o tratamento com os dois anti-inflamatórios analisados preveniu substancialmente

este aumento induzido pela L-DOPA. Apesar de o inibidor específico da enzima COX-2 (Celec) não ser efetivo na diminuição da LID, reduziu significativamente a produção de PGE₂. O outro fármaco analisado, CBD, ao atenuar a LID, também gerou uma redução na expressão de COX-2 e nos níveis de PGE₂. Desta forma, é possível sugerir que a produção de prostaglandinas está associada à manifestação da LID. Entretanto, a ausência de efeito do Celec sobre a manifestação da LID indica que o envolvimento deste metabólito também pode ser um epifenômeno.

Considerando a hipótese de que a COX-2 e a consequente produção de prostaglandinas podem fazer parte da indução de uma plasticidade anormal no estriado que caracteriza esta patologia, o uso de inibidores de COX de forma concomitante ao início do tratamento com L-DOPA pode representar um método interessante para mitigar a LID. O estudo de Teema *et al.* (2016) testou a importância de adicionar ibuprofeno ou piroxicam à terapia com L-DOPA e se eles podem reduzir e/ou atrasar o desenvolvimento da LID em ratos parkinsonianos. Neste estudo, a combinação de L-DOPA a doses mais altas de ibuprofeno ou piroxicam preservaram a função motora por mais tempo e atrasaram o desenvolvimento da LID. Entretanto, o estudo fez um acompanhamento do tratamento com L-DOPA por 10 semanas, e os efeitos positivos dos inibidores de COX foi eficiente somente após a análise da décima semana, sem apresentar resultados significativos na análise anterior, com cinco semanas. Também neste estudo, um aumento da COX-2 foi encontrado após a administração de rotenona no modelo, e o tratamento com L-DOPA não influenciou a expressão desta enzima.

Portanto, indicamos que o tratamento com inibidores da COX não representa um bom modelo farmacológico para diminuir um quadro de LID em que os AIMs induzidos por L-DOPA já tenham sido estabelecidos. Portanto, o aumento de COX-2 pode fazer parte ou ser consequência da ativação aberrante neuroquímica/molecular que resulta na formação da plasticidade sináptica mal adaptada característica desta patologia.

CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO:

Este trabalho colabora com a discussão da participação de um processo importante e recém descrito na LID: a neuroinflamação. Aqui, apresentamos a hipótese de uma função alternativa para o evento neuroinflamatório ocorrente no estriado lesionado após o tratamento prolongado com L-DOPA. Ao utilizarmos o modelo de implantação de LID em camundongos hemiparkinsonianos, nós demonstramos que:

- A LID acompanha o aumento de fatores tipicamente pró-inflamatórios, como a enzima COX-2 e o fator de transcrição NF- κ B, no estriado lesionado de animais discinéticos juntamente ao aumento de genes de resposta imediata classicamente associados a esta desordem, como o FosB e a p-AcH3.

- Um aumento na atividade astrocitária (e possivelmente microglial) também é observado no estriado dorsolateral lesionado após o tratamento prolongado com L-DOPA.

- O estímulo com glutamato nos astrócitos resulta no aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias já demonstradas na LID, como o TNF- α (Mulas *et al.*, 2016); enquanto o estímulo com L-DOPA/DA reduz a produção de citocinas nessas células.

- O tratamento sub crônico com o anti-inflamatório inespecífico CBD (associado à CPZ) levou a uma atenuação da LID previamente estabelecida; entretanto, o uso de inibidores da COX, como o Celec, não diminuiu a manifestação da LID.

Neste cenário, sugerimos que os mecanismos relacionados à neuroinflamação contribuem para adaptações neurais persistentes que mantenham o encéfalo em um estado propenso à LID (Cenci e Lindgren, 2007; Del Bel *et al.*, 2016). A produção de fatores inflamatórios, como a COX-2, NF- κ B, citocinas como o TNF- α e até mesmo a ativação de células gliais como o astrócito podem contribuir para a perpetuação de uma atividade pós-sináptica estriatal anormal que ocasionam a “má plasticidade” que caracteriza a LID, em vez de gerarem a resposta clássica inflamatória resultante em processo neurodegenerativo típica da DP. O aumento da ativação glial/astrocitária juntamente à produção de proteínas indutoras de resposta inflamatória levariam a modificações comportamentais que resultam na LID. Além disso, a COX-2 parece ser uma resultante deste processo, podendo funcionar como mediador da plasticidade sináptica estriatal. Desta forma, os anti-inflamatórios inespecíficos – mas talvez não os inibidores de COX - constituem um grupo promissor para o tratamento desta doença. Estudos posteriores são necessários para melhor abordar o papel desempenhado

pelos fatores pró-inflamatórios na gênese desses padrões de atividade patológica. A hipótese da participação dos fatores inflamatórios envolvidos no surgimento da LID está demonstrada no esquema 1.

Esquema 1: Mecanismo proposto apontando como a neuroinflamação desencadeia a LID e como drogas anti-inflamatórias modificam a sinalização inflamatória. A L-DOPA exógena, após ser convertida a DA, aumenta os níveis de glutamato, que possui ação central na resposta inflamatória participante da LID. O aumento destes dois neurotransmissores está envolvido com a expressão do fator de transcrição NF-κB. O glutamato, especificamente, também induz a produção de TNF-α nos astrócitos. Estes dois últimos podem estar indiretamente envolvidos na LID (linha tracejada), em um mecanismo de autorregulação que aumentaria ainda mais a produção de glutamato e levaria a alterações na atividade neuronal pós-sináptica, descritos na patologia. Por outro lado, o aumento da COX-2 e a consequente produção de PGE₂ parecem ser consequência deste processo de ativação irregular dos receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos/neuroplasticidade decorrente da LID. O anti-inflamatório eficaz em inibir a LID (CPZ+CBD) podem ter sua ação prévia à manifestação da LID, impedindo o acúmulo destes fatores inflamatórios e talvez afetando a liberação de DA e glutamato, ainda que indiretamente. Por outro lado, a inibição da atividade enzimática da COX-2 não foi suficiente para inibir a LID ou a expressão de fatores associados a ela (FosB e COX-2), sugerindo que a cascata de síntese de prostaglandinas não é essencial para a manifestação da LID. CBD: canabidiol; Celec: celecoxibe; COX: ciclooxygenase; CPZ: capsazepina; DA: dopamina; Glu: glutamato; NF-κB: fator nuclear kappa B; PGE: prostaglandina E; TNF: fator de necrose tumoral.

ESTUDOS COMPLEMENTARES – O EFEITO PROTETOR DA DA EM
CÉLULAS MICROGLIAIS

6. RESULTADOS COMPLEMENTARES:

Contexto: Nesta parte do trabalho, nosso objetivo foi verificar se a liberação de glutamato - aqui sugerido como indutor da ativação de astrócitos e consequente liberação de citocinas - é crucial para que as células microgliais produzam eventos neurotóxicos no encéfalo. A liberação de glutamato, juntamente com várias outras excitotoxinas, é fundamental para que as células microgliais produzam eventos neurotóxicos no encéfalo. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e os transtornos em sua homeostase foram relatados na maioria das doenças neurodegenerativas, incluindo a DP e a LID. Estudos *in vitro* revelaram que diferentes estímulos patogênicos que ativam a micróglia, como o LPS, desempenham um papel prejudicial na liberação de glutamato no ambiente extracelular ou na modificação da sua homeostase (Domercq *et al.*, 2013).

Juntamente com a perda de neurônios dopaminérgicos e uma reação glial substancial, o acúmulo de α -sin em forma fibrilar (α -sin_f, na forma de Corpos de Lewy) emergiu como uma das características principais na patogênese da DP. Adicionalmente, modelos experimentais modificados geneticamente para superexpressar α -sin são utilizados para induzir AIMs e/ou movimentos estereotipados através da administração de L-DOPA ou agonistas dopaminérgicos (Brehm *et al.*, 2015; Fleming *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 2016). A neurotoxicidade de α -sin é principalmente causada por seus oligômeros e polímeros agregados solúveis ou insolúveis. A implicação da α -sin agregada (α -sin_f) na DP inclui formas diferentes para incitar danos neurotóxicos, incluindo a disfunção mitocondrial, a produção de ROS e neuroinflamação (Acuña *et al.*, a ser publicado, Levy *et al.*, 2009). Além da α -sin intracelular, a α -sin extracelular também pode induzir estresse oxidativo através da ativação de células microgliais (Lee *et al.*, 2008). A forma agregada da α -sin liberada por neurônios tem a capacidade de ativar a micróglia especificamente (Zhang *et al.*, 2005), provavelmente através da ativação de receptores TLR2 (Kim *et al.*, 2013) e P2X7 (Jiang *et al.*, 2015). No entanto, embora a ativação microglial induzida por α -sin resulte em aumento da produção de ROS, não se sabe ao certo se a ativação da micróglia por esta proteína resulta em um processo de liberação de glutamato que pode estar envolvido com a perda de neurônios dopaminérgicos.

A ausência de DA na via nigroestriatal também pode ter uma parte crítica nos efeitos excitotóxicos da α -sin. Já foi descrito que este neurotransmissor pode proteger os neurônios da excitotoxicidade do glutamato (Amano *et al.*, 1994; Vaarmann *et al.*, 2013), entre outras

funções neuroprotetoras para células neuronais e gliais (Bozzi *et al.*, 2000; Chang e Liu, 2000; Kitamura *et al.*, 2002; Pirtosek e Flisar, 2004; Yoshioka *et al.*, 2016). Considerando que o estresse oxidativo, através da geração de ROS, é reconhecido como um fator importante na progressão desta doença (Asanuma *et al.*, 2003) e DA possui um potencial papel protetor para células gliais, conforme descrito neste trabalho, e propriedades antioxidantes (Yen e Hsieh, 1997), é possível hipotetizar que DA poderia desempenhar um papel protetor na ação de α -sin em células microgliais.

Objetivos específicos:

1) *Verificar se a alfa-sinucleína na forma fibrilar induz a liberação de fatores inflamatórios e através de quais receptores a alfa-sinucleína extracelular atua:* Tentando mimetizar um quadro da DP onde, além da ausência de DA, existe acúmulo de fibras de alfa-sinucleína, fomos verificar se o processo inflamatório ocorrente na DP existe devido a um possível estímulo glial causado pelos agregados desta proteína. Se positivo, de que forma essa proteína poderia estar levando a um processo inflamatório.

2) *Analisar se a DA consegue modular a liberação de fatores produzidos através da alfa-sinucleína e através de que via a DA poderia estar modulando as respostas microgliais causadas pela alfa-sinucleína:* Considerando que o processo inflamatório ocorrente na DP ocorre concomitantemente à ausência de DA no encéfalo parkinsoniano, analisaremos se a presença de DA exógena altera as respostas gliais induzidas pela alfa-sinucleína. Caso positivo, verificaremos através de que mecanismo neuroquímico a DA pode estar atuando nesta resposta.

Resultados:

A estimulação com α -sin_f em células microgliais aumenta os níveis extracelulares de glutamato: A α -sin_f em diferentes concentrações (0,5, 1 e 5 μ M) e a forma monomérica de α -sin (Mono; 5 μ M) foram adicionadas aos poços contendo 10^6 células microgliais durante 24h para avaliar se a produção de glutamato foi modificada. O LPS (10 ng/ml) foi utilizado como controle positivo. O tratamento apresentou efeito geral significativo nos níveis extracelulares de glutamato ($F(5, 36) = 40,78$; $p < 0,05$). A α -sin mono (5 μ M) ou concentrações mais baixas de α -sin_f (0,5 e 1 μ M) não alteraram o glutamato extracelular ($p > 0,05$ vs. controle). No entanto, a concentração de 5 μ M de α -sin_f induziu um aumento de 5 a 6 vezes nos níveis de glutamato, semelhante ao LPS ($p < 0,05$; figura 53A). Diferentemente das

células microgлияis, a administração de α -sin_f ou LPS em astrócitos durante 24h não foi capaz de induzir um aumento nos níveis de glutamato extracelular ($F(2, 18) = 2,144$; $p > 0,05$; Material Suplementar 10).

Para confirmar que o aumento de glutamato causado pela α -sin_f não estava estritamente relacionado a um aumento no número de células reativas, quantificamos núcleos de células marcadas com DAPI ($F(2, 32) = 9,531$; $p < 0,05$; figura 53B). Inesperadamente, α -sin_f aumentou o número de células microgлияis apenas em 25% ($p < 0,05$) enquanto o LPS aumentou em 18% ($p < 0,05$), sugerindo que o aumento na liberação de glutamato não é completamente justificado por um aumento no número de células. Com base nestes dados, todos os experimentos subsequentes foram feitos com a concentração de 5 μ M de α -sin_f.

Para assegurar que as alterações nos níveis de glutamato induzidos por α -sin_f ou LPS podem ser atribuídas à ativação microgлияl, a morfologia celular foi analisada (figura 53C). As células microgлияis tratadas com α -sin_f apresentaram características diferentes de morfologia celular, com um aumento na superfície celular e um maior comprimento de seus processos quando comparados às células não tratadas. Foi detectada uma maior expressão de Iba-1 em todo o corpo celular, corroborando os dados de Acuña *et al.* (a ser publicado). A estimulação do LPS também promoveu uma mudança na morfologia microgлияl. No entanto, as células adquiriram uma morfologia associada à estimulação LPS, com um formato ameboide com processos menores e mais curtos (Orihuela *et al.*, 2016).

Figura 53: Ação da α -sin_f sobre os níveis de glutamato, número de células DAPI+ e morfologia da micróglia. (A) A análise de glutamato extracelular demonstrou que a α -sin_f (5 μ M) induziu um aumento de 5-6 vezes em sua liberação, semelhante ao LPS (10 ng/ml). Menores concentrações de α -sin_f e a α -sin mono (5 μ M) não foram efetivas. (B) A quantificação de células DAPI+ após 24h de estimulação com α -sin_f indicou uma proliferação de aproximadamente 25%; o LPS induziu cerca de 18% da proliferação. (C) Fotomicrografias de imunocitoquímica realizadas para CD11b, Iba-1 e DAPI após estimulação com α -sin_f e LPS em células microgliais. Os tratamentos com α -sin_f e LPS causaram alterações distintas na morfologia celular. Em ambos os tratamentos, houve aumento na expressão de Iba-1 e de células DAPI+. * $p < 0,05$ vs. controle (-) (ANOVA de uma via seguida de Bonferroni, $n = 6$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Os níveis aumentados de glutamato pela α -sin dependem da ativação de receptores P2X7 e TLR2: A α -sin_f pode ativar a micróglia agindo como um agonista dos receptores de membrana TLR2 e P2X7. Estes dois receptores estão envolvidos na resposta inflamatória provocada por estas células em resposta a estímulos patogênicos ou danosos ao SNC (Acuña *et al*, a ser publicado; Jiang *et al*, 2015; Kim *et al*, 2013). À medida que estimulamos as células com α -sin_f, confirmamos a presença dos agregados após 24h de tratamento especificamente no grupo tratado. Os agregados de α -sin foram acoplados principalmente a extensões celulares, sugerindo uma possível ligação da α -sin_f às membranas microgliais, consistente com resultados anteriores da literatura (Dikiy e Eliezer, 2012; figura 54A).

Verificamos se o aumento do glutamato extracelular promovido por α -sin_f seria alterado na presença do antagonista específico do receptor P2X7, JNJ (J; 20 μ M), e do receptor TLR2, anti-TLR2 (T; 2,5 μ g/ml), individualmente ou combinados. Considerando que esses receptores levam à ativação da sinalização PI3K/AKT (Jiang *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2013), também inibimos a fosforilação de AKT com LY (2,5 μ M). Um efeito geral foi encontrado na presença dos antagonistas ($F(4, 43) = 14,64$, $p < 0,05$) e na presença de α -sin_f ($F(1, 43) = 34,93$, $p < 0,05$), com uma interação significativa entre eles ($F(4, 33) = 6,301$, $p < 0,05$; figura 54B). A análise pós hoc mostrou que o JNJ ($p < 0,05$ vs. controle) e o anti-TLR2 ($p < 0,05$ vs. controle) tiveram um efeito robusto na redução do glutamato extracelular induzido pela α -sin_f, enquanto a associação deles apresentou uma diminuição mais forte, reduzindo aos seus níveis controle ($p < 0,05$ vs. α -sin_f). Este efeito foi compartilhado com o LY, que também diminuiu o glutamato extracelular de volta aos níveis do controle ($p < 0,05$ vs. α -sin_f).

Os efeitos de α -sin_f no aumento dos níveis de glutamato foram reproduzidos pelo agonista do receptor P2X7, BzATP (500 μ M), e pelo agonista do receptor TLR2, PAM (1 μ g/ml). A administração desses agonistas resultou em um aumento dos níveis de glutamato ($F(6, 56) = 21,09$, $p < 0,05$, figura 54C). O BzATP induziu um aumento significativo ($p < 0,05$ vs. controle) que foi bloqueado pelo antagonista JNJ ($p < 0,05$ vs. BzATP). O PAM também aumentou os níveis de glutamato ($p < 0,05$ vs. controle) e o efeito foi bloqueado por seu antagonista específico anti-TLR2 ($p < 0,05$ vs. PAM). A associação dos agonistas induziu um aumento ainda mais evidente no glutamato extracelular ($p < 0,05$ vs. controle) e o efeito também foi inibido pela associação dos antagonistas ($p < 0,05$ vs. BzATP+PAM).

Figura 54: Envolvimento dos receptores P2X7 e TLR2 nos níveis de glutamato extracelular induzidos por α -sin_f. (A) Fotomicrografias de imunocitoquímica para CD11b, α -sin e DAPI após estimulação com α -sin_f na microglia. O anticorpo para α -sin reagiu especificamente no grupo tratado e os agregados foram preferencialmente encontrados em torno dos processos microgliais. (B) O pré-tratamento com o antagonista de P2X7, JNJ (J) e o antagonista de TLR2, anti-TLR2 (T), individualmente ou combinados entre si reduziram os níveis de glutamato após estimulação com α -sin_f, similar ao LY. (C) A estimulação com BzATP e PAM (agonistas de P2X7 e TLR2, respectivamente) reproduziu os achados com α -sin_f e foram bloqueados por seus respectivos antagonistas. * $p < 0,05$ vs. controle (-); # $p < 0,05$ vs. α -sin_f (B: ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni, $n = 6$ /grupo; C: ANOVA de uma via seguida de Bonferroni, $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

A produção de ROS é essencial para aumento de glutamato extracelular induzido por α -sin_f: As células microgliais podem liberar glutamato em resposta a eventos excitotóxicos, como o estímulo com LPS, que leva à ativação celular e ao aumento concomitante da taxa de produção de ROS (Domercq *et al.*, 2013). Com base na hipótese de que α -sin_f poderia elevar os níveis extracelulares de glutamato através da produção de ROS, foram adicionados ao meio de cultura o antioxidante inespecífico TROL (10 μ M) e os inibidores de NADPH oxidase (NOX) APO (300 μ M) e DPI (1 μ M). A α -sin_f induziu um efeito geral sobre o glutamato extracelular ($F(1, 56) = 33,82$, $p < 0,05$), assim como os antioxidantes ($F(3, 56) = 26,25$, $p < 0,05$), com uma interação robusta entre eles ($F(3, 56) = 13,16$, $p < 0,05$, figura 55A). Observamos que o aumento dos níveis de glutamato induzidos por α -sin_f ($p < 0,05$ vs. controle) foi completamente prevenido pelo pré-tratamento com TROL, APO e DPI (TROL, APO e DPI: $p < 0,05$ vs. α -sin_f).

Como controle positivo, confirmamos que α -sin_f de fato induziu um efeito geral na produção de ROS (F (1, 70) = 19,38, $p < 0,05$), semelhante aos antioxidantes (F (3, 70) = 15,95, $p < 0,05$). Foi revelada uma interação significativa entre esses fatores (F (3, 70) = 3,78, $p < 0,05$, figuras 55B e 55C). Previsivelmente, a α -sin_f *per se* aumentou os níveis de ROS produzidos pelas células microgliais ($p < 0,05$ vs. controle) e a presença dos antioxidantes TROL, APO e DPI aboliu os efeitos da α -sin_f (TROL, APO e DPI: $p < 0,05$ vs. α -sin_f).

Figura 55: Efeito dos antioxidantes TROL, APO e DPI sobre o aumento extracelular de glutamato induzido por α -sin_f. (A) A análise de glutamato extracelular mostrou que os antioxidantes TROL, APO e DPI foram efetivos em inibir o aumento do neurotransmissor promovido pela α -sin_f (B) Fotomicrografias representativas da produção intracelular de ROS detectada por CellROX em células microgliais DAPI+ após estimulação com α -sin_f na presença ou ausência de antioxidantes. (C) A análise de fluorescência por CellROX indicou que os três antioxidantes impediram a indução de ROS causada por α -sin_f. * $p < 0,05$ vs. controle (-), # $p < 0,05$ vs. α -sin_f (ANOVA de duas vias seguida por Bonferroni. A: $n = 8$ /grupo; C: $n = 10$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

A liberação de glutamato ocorre através da ativação do transportador xCT: O mecanismo de troca do xCT é responsável pela grande maioria do glutamato exportado derivado da micróglia ativada, que é altamente elevada em resposta a estímulos excitotóxicos/fisiopatológicos que aumentam a produção de ROS (Conrad e Sato, 2012; Domercq *et al.*, 2013; Mesci *et al.*, 2015). Portanto, verificamos se os níveis aumentados de

glutamato extracelular causados por α -sin_f ocorreram devido a uma liberação produzida pelo transportador xCT, usando para isso, seu inibidor específico Sulfa (50 μ M).

Novamente, a estimulação com α -sin_f apresentou efeito geral significativo ($F(1, 20) = 121,3$, $p < 0,05$), semelhante a Sulfa ($F(1, 20) = 212,9$, $p < 0,05$), com interação entre eles ($F(1, 20) = 21,68$, $p < 0,05$; figura 56A). Enquanto α -sin_f aumentou significativamente os níveis de glutamato extracelular ($p < 0,05$ vs. controle), o tratamento prévio com Sulfa erradicou completamente sua liberação, tanto basalmente ($p < 0,05$ vs. controle) quanto induzido por α -sin_f ($p < 0,05$ vs. α -sin_f).

Uma vez que a liberação de glutamato através do sistema xCT é concomitante ao aumento dos níveis de cistina intracelular (Lewerenz *et al.*, 2013), para confirmar a participação deste transportador no aumento dos níveis extracelulares de glutamato, realizamos um ensaio para medir a absorção de cistina radiomarcada. Mais uma vez, a α -sin_f ($F(1, 20) = 381,6$, $p < 0,05$) e a Sulfa ($F(1, 20) = 85,42$, $p < 0,05$) promoveram um efeito geral significativo nos níveis de glutamato, com uma interação significativa ($F(1, 20) = 10,99$, $p < 0,05$; figura 56B). Semelhante à análise de liberação de glutamato, a α -sin_f aumentou os níveis de [14C]-cistina ($p < 0,05$ vs. controle) e a Sulfa bloqueou parcialmente o efeito α -sin_f ($p < 0,05$ vs. α -sin_f). A sulfa sozinha também foi capaz de reduzir a captação de [14C]-cistina ($p < 0,05$ vs. controle).

Uma vez que o efeito da α -sin_f sobre liberação de glutamato e captação de [14C]-cistina poderia estar relacionado a uma síntese alterada deste transportador, também verificamos a expressão de xCT. Surpreendentemente, o tratamento com α -sin_f por 24h nas células microgliais não foi efetivo na alteração da expressão deste transportador ($t=2,517$, $df=10$, $p > 0,05$; figuras 56C e 56D).

Figura 56: Dependência do transportador xCT no transporte de glutamato aumentado pela α -sin_f. (A) O inibidor do transportador xCT, Sulfa, reduziu os níveis de glutamato extracelular basal e induzido por α -sin_f. (B) A análise de captação de [¹⁴C]-cistina mostrou que a α -sin_f aumentou a captação de cistina radiomarcada e a Sulfa diminuiu essa captação, tanto basal quanto aumentada pela α -sin_f. (C) Fotomicrografias de imunocitoquímica para xCT e DAPI após estimulação com α -sin_f na micróglia. (D) A análise de expressão de xCT indicou que o tratamento com α -sin_f não alterou a expressão do transportador. * $p < 0,05$, vs. controle (-); # $p < 0,05$ vs. α -sin_f. (A-B: ANOVA de duas vias seguida por Bonferroni; D: Student teste t não-pareado, $n = 6$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

A DA inibe o aumento de glutamato induzido por α -sin_f por ativação de D1R e a inibição de p-AKT: A DA foi descrita como tendo uma potencial ação protetora para células neuronais e gliais (Amano *et al.*, 1994; Bozzi *et al.*, 2000; Chang e Liu, 2000; Kitamura *et al.*, 2002; Pirtosek e Flisar, 2004; Vaarmann *Et al.*, 2013; Yoshioka *et al.*, 2016). A falta de DA juntamente com a formação de α -sin_f são um dos principais eventos participantes da fisiopatologia da DP. A ausência deste neurotransmissor pode ter uma função importante nos eventos excitotóxicos que ocorrem na doença. Com base nisso, nós questionamos se a DA

teria um papel protetor contra a excitotoxicidade derivada da exposição de células microgliais a α -sin_f.

Nossos resultados demonstraram que a estimulação prévia com DA (10 μ M) causou um efeito geral significativo ($F(1, 28) = 157,3$, $p < 0,05$), da mesma forma que α -sin_f ($F(1, 28) = 55,23$, $p < 0,05$), com interação robusta ($F(1, 28) = 55,23$, $p < 0,05$; figura 57A). Observamos através da análise pós-hoc que a α -sin_f aumentou os níveis de glutamato ($p < 0,05$ vs. controle) e os níveis extracelulares tornaram-se inexistentes após a incubação prévia com DA individualmente ($p < 0,05$ vs. controle) ou quando associado à α -sin_f ($p < 0,05$ vs. α -sin_f).

Para avaliar se o efeito protetor da DA foi dependente da ativação dos receptores D1 ou D2, estimulamos as células microgliais com o agonista D1R, SKF (10 μ M), o agonista D2R, 2-Br (10 μ M), e o ativador direto da adenilil ciclase FK (10 μ M) na presença de α -sin_f. Um efeito geral de tratamento foi revelado ($F(4, 27) = 247,6$, $p < 0,05$; figura 57B) e a análise pós-hoc indicou que o aumento evocado por α -sin_f ($p < 0,05$ vs. controle) foi completamente abolido por SKF ($p < 0,05$ vs. α -sin_f), mas não por 2-Br ($p > 0,05$ vs. α -sin_f). O FK, por sua vez, diminuiu parcialmente os níveis de glutamato ($p < 0,05$ vs. α -sin_f), sem reproduzir completamente os dados da DA ou do SKF.

Nossos resultados anteriores mostraram que a p-AKT pode ter um papel ativo nos níveis aumentados de glutamato causados por α -sin_f. A DA já foi demonstrada como capaz de inibir a fosforilação de AKT em diferentes modelos experimentais (Chen *et al.*, 2008; Mannoury la Cour *et al.*, 2011). Em nosso modelo, DA, FK e LY na presença de α -sin_f apresentaram efeito geral significativo ($F(4, 15) = 20,72$, $p < 0,05$, figuras 57C e 57D). Corroborando o resultado prévio do grupo (Acuña *et al.*, a ser publicado), a α -sin_f aumentou a fosforilação de AKT ($p < 0,05$ vs. controle) e tanto a DA quanto a FK reduziram a fosforilação de AKT de volta aos níveis de controle ($p < 0,05$ vs. α -sin_f). Como controle positivo, o LY reduziu fortemente os níveis de p-AKT ($p < 0,05$ vs. α -sin_f).

Figura 57: Efeito da DA sobre os níveis aumentados de glutamato extracelular e sua via de sinalização. (A) Os níveis de glutamato basal e induzidos por α -sin_f foram encontrados reduzidos após a pré-exposição a DA (10 μ M). (B) O agonista D1R, SKF, reproduz o efeito da DA prevenindo completamente o aumento do glutamato; o agonista D2R, 2-Br (10 μ M), não apresentou efeito semelhante. A FK (10 μ M) impediu parcialmente o aumento do glutamato. (C) Western blots representativos da produção microglial de p-AKT e AKT (60 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (D) A quantificação de Western Blot de p-AKT/AKT após estimulação com α -sin_f indicou que o tratamento com α -sin_f aumentou significativamente o p-AKT, e este efeito foi impedido pela DA, FK e LY. * $p < 0,05$ vs. controle (-), # $p < 0,05$ vs. α -sin_f (A: ANOVA de duas vias seguida por Bonferroni, $n = 6$ /grupo; B-D: ANOVA de uma via seguida por Bonferroni. B: $n = 6-8$ /grupo; D: $n = 4$ /grupo). Os dados representam a média $\pm$ EPM.

Os níveis extracelulares de glutamato diminuídos por DA estão associados à redução de ROS: Uma vez que a DA - descrito como um antioxidante potente (Yen e Hsieh, 1997) - inibiu o aumento dos níveis de glutamato e a fosforilação do AKT, o próximo passo foi verificar se este neurotransmissor poderia regular a expressão da enzima NOX, enzima envolvida na síntese de ROS, e reduzir a produção de ROS (Que provamos estar envolvidos com a cascata de liberação de glutamato).

Um efeito geral dos inibidores DA, FK e LY também foi encontrado sobre a produção de ROS ($F(3, 28) = 24,73$, $p < 0,05$), de uma maneira semelhante à de α -sin_f ($F(1, 28) = 27,14$, $p < 0,05$), com uma forte interação entre eles ($F(3, 28) = 4,241$, $p < 0,05$, figuras 58A e 58B). Especificamente, a α -sin_f aumentou o nível de ROS ($p < 0,05$ vs. controle), e o pré-tratamento com DA ($p < 0,05$ vs. α -sin_f), FK ($p < 0,05$ vs. α -sin_f) e LY ($p < 0,05$ vs. α -sin_f) foi capaz de bloquear este efeito. A DA também inibiu a produção basal de ROS ($p < 0,05$ vs. controle).

Os inibidores DA, FK e LY na presença de α -sin_f também tiveram um efeito geral significativo sobre a expressão de NOX2 ($F(4, 50) = 15,55$, $p < 0,05$, figuras 58C e 58D). Consistente com nossas descobertas anteriores, a α -sin_f aumentou de forma previsível a expressão de NOX2 ($p < 0,05$ vs. controle) enquanto a DA e o LY foram capazes de prevenir os efeitos da α -sin_f ($p < 0,05$ vs. α -sin_f). Mais uma vez, o FK apenas reverteu os efeitos de α -sin_f de forma parcial ($p < 0,05$ quando comparado a α -sin_f).

Figura 58: A ação da DA na produção de ROS e expressão de NOX2. (A) Fotomicrografias da produção intracelular de ROS detectada por CellROX na micróglia DAPI+ após estimulação com α -sin. (B) A análise de fluorescência por CellROX indicou que a DA e o LY impediram a indução de ROS induzida por α -sin, enquanto a FK apenas diminuiu parcialmente os níveis de ROS. (C) Fotomicrografias de imunocitoquímica para NOX2 e DAPI após estimulação com α -sin, impedido pelo pré-tratamento com DA (10 μ M), LY (2,5 μ M) e parcialmente por FK (10 μ M). * $p < 0,05$ vs. controle (-); # $p < 0,05$ vs. α -sin. (B: ANOVA de duas vias seguida por Bonferroni, $n = 8$ /grupo; D: ANOVA de uma via seguida por Bonferroni, $n = 12$ / grupo). Os dados representam a média $\pm$ EPM.

DISCUSSÃO – Estudos Complementares

Uma questão importante considerada em nosso estudo foi se as células microgлияis ativadas poderiam liberar glutamato - um marcador neurotóxico - em resposta ao estímulo fisiopatológico envolvido na DP, como a exposição a α -sin_f e se a DA, já demonstrada como possível neuroprotetora, seria capaz de impedir este processo inflamatório. Aqui, mostramos que: (i) α -sin_f em uma concentração relativamente alta, mas não a α -sin monomérica ou concentrações mais baixas de α -sin_f, induziu um aumento no glutamato extracelular produzido por células microgлияis, de uma maneira similar ao LPS. (ii) Este aumento no glutamato extracelular dependeu da ativação dos receptores P2X7 e TLR2, com o consequente desencadeamento da sinalização de PI3K/AKT. (iii) A exposição das células microgлияis aos antioxidantes reduziu os níveis extracelulares de glutamato com associação direta à redução dos níveis de ROS. (iv) O inibidor do transportador de xCT sulfasalazina aboliu a liberação de glutamato induzida por α -sin_f, com diminuição concomitante da captação de [14C]-cistina, previamente aumentada por α -sin_f. (v) O neurotransmissor DA impediu a liberação de glutamato induzida por α -sin_f, ativando D1R e inibindo a fosforilação de AKT. (vi) A redução da liberação de glutamato causada por DA está associada a uma atenuação na expressão de NADPH oxidase e níveis reduzidos de ROS. Finalmente, (vii) a ativação da enzima adenilil ciclase e o consequente aumento dos níveis de AMPc só puderam reproduzir parcialmente os efeitos de DA. O mecanismo pelo qual α -sin_f produziu níveis aumentados de glutamato e DA interferiu está demonstrado no esquema 2.

Esquema 2: Desenho esquemático mostrando como a DA poderia prevenir a liberação de glutamato induzida por α -sin_f em células microgliais. A α -sin_f extracelular estimula os receptores P2X7 e TLR2, resultando na ativação de uma via de sinalização dependente de PI3K que controla a produção de ROS através da enzima NOX2. O aumento da produção de ROS estimula a atividade do antiporter xCT e, como consequência, a liberação de glutamato. A liberação de glutamato induzida por α -sin_f é inibida por um inibidor de xCT, sulfasalazina, e por vários antioxidantes, como apocinina, DPI e Trolox. A DA também pode inibir a liberação de glutamato induzida por α -sin_f através de um efeito antioxidante mediado pela ativação de D1R. A elevação de AMPc reproduz apenas parcialmente os efeitos da ativação do receptor D1, indicando que o acoplamento não-canônico da proteína G ao D1R pode ocorrer em células microgliais.

Células microgliais e liberação de glutamato por α -sin_f:

Neuroinflamação, estresse oxidativo e excitotoxicidade são características distintas, mas comuns de vários distúrbios neurológicos, incluindo a DP e a LID (Barnum *et al.*, 2008; Bortolanza *et al.*, 2015a; 2015b; Del Bel *et al.*, 2016; Hirsch e Hunot, 2009; Ivanova e Loonen, 2016; Tilleux e Hermans, 2007). Como consequência de mudanças neuroquímicas em seu ambiente local, as células microgliais se ativam e liberam uma variedade de fatores, incluindo citocinas, proteases, radicais livres tóxicos e o glutamato como potencial neurotransmissor citotóxico. O glutamato desempenha um papel central na neurotransmissão excitatória e participa de uma ampla gama de funções neurais essenciais, incluindo plasticidade sináptica, memória e aprendizagem e potencialização a longo prazo. No entanto, as modificações na sua homeostase podem resultar em consequências prejudiciais substanciais nos neurônios através da geração de cascatas neurotóxicas ou excitotóxicas (Olney, 1990).

A ativação de células microgliais, as células imunes residentes do encéfalo, desempenha um papel fundamental nos processos inflamatórios que participam da progressão da DP. Além das suas funções clássicas no encéfalo normal, a micróglia está implicada na grande maioria das patologias do SNC onde podem ser encontrados distúrbios do glutamato, como a doença de Alzheimer, esclerose lateral amiotrófica e convulsões epiléticas derivadas do glioma, entre outras (Barger *et al.*, 2007; Buckingham *et al.*, 2011; Mesci *et al.*, 2015). Na DP, uma reação glial maciça faz parte de uma das características fisiopatológicas principais desta doença juntamente à perda de neurônios dopaminérgicos. Mais especificamente, observa-se uma resposta microglial vigorosa no encéfalo pós-morte do paciente DP, juntamente a um grau menos pronunciado de reação astrocitária, sugerindo que a microgliose reativa persistente pode ter uma contribuição central na progressão da DP (Forno *et al.*, 1992; Langston *et al.*, 1999; McGeer *et al.*, 1988; Mirza *et al.*, 2000; Teismann e Schulz, 2004).

Relatos recentes sugeriram que a excitotoxicidade causada pelo glutamato contribui para a morte celular dopaminérgica na SNpc e consequente degeneração da via nigroestriatal na DP (Lavoie e Parent, 1994, Blandini *et al.*, 2004). Esta sugestão baseia-se em evidências que mostram que essas células apresentam maior vulnerabilidade ao glutamato extracelular. Além disso, os relatórios demonstraram que, após a redução experimental de entradas glutamatérgicas ou a atividade do receptor NMDA no SNC de modelos de DP, há um aumento na sobrevivência celular dopaminérgica (Piallat *et al.*, 1996; Wallace *et al.*, 2007).

Sob condições ativadas, as células microgliais são importantes ajustadoras da homeostase de glutamato, liberando aminoácidos excitatórios (Piani *et al.*, 1992), mediando a captação de glutamato (resultando em acumulação extracelular de glutamato) e interferindo na transmissão sináptica ou na liberação astrocitária deste neurotransmissor (Domercq *et al.*, 2013). Nesta parte do trabalho, descobrimos que a micróglia tem a capacidade de produzir níveis anormais de glutamato em resposta a α -sin_f, uma proteína propensa à agregação com papel central na patologia da DP. Possivelmente, esta é a primeira vez descrita que as células microgliais podem contribuir para o desenvolvimento da DP liberando glutamato como consequência da ativação celular induzida pela forma agregada de α -sin.

Um crescente número de evidências que debatem o dano excitotóxico na DP concorda que a liberação de glutamato dependente de neurônio tem uma parte crucial na sua patogênese (Piallat *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 1998). No entanto, o papel das células gliais na morte neuronal típica da DP ainda não foi completamente elucidado. Aqui, apresentamos a hipótese

de que o glutamato liberado por células microgliais em resposta à exposição a α pode ser um contribuinte importante para a progressão da DP. A acumulação e agregação de α -sin é um fenômeno clássico de DP, ocorrendo em muitos neurônios centrais e periféricos (Watson *et al.*, 2012; Braak *et al.*, 2003) e a transmissão célula a célula de α -sin foi sugerida para estar envolvida na progressão da doença (Lee *et al.*, 2014).

As células microgliais têm sido amplamente reconhecidas por fazer contato físico com neurônios pós-morte ou em processo de fagocitose, que são um dos principais produtores da forma agregada de α S no encéfalo DP (Eyo e Wu, 2013). A α -sin ativa diretamente células microgliais através de uma via de ativação clássica e aumenta a expressão de um subconjunto de receptores correlacionados com a neuroinflamação (Beraud *et al.*, 2013). Uma vez que a α -sin insolúvel pode ser liberada por neurônios em processo de morte celular e esses agregados podem ativar diretamente células microgliais (Kim *et al.*, 2013), os efeitos encontrados nessas células podem ser explicados pela habilidade de α -sin de se ligar a receptores de membrana microgliais específicos e possivelmente gerar um microambiente excitotóxico anômalo para as células circundantes.

Na LID, a ação da micróglia sobre a produção de glutamato ainda é desconhecida. Apesar de ser possível que também exista aumento de glutamato produzido por essas células, os modelos animais utilizados para indução da LID não apresentam em sua totalidade expressão de agregados de α -sin. Portanto, nesse modelo animal, caso haja um aumento de glutamato produzido pela micróglia, esse aumento, pelo menos em modelos animais, não seria induzido pela α -sin. Isso não impossibilita, entretanto, que outros fatores estejam envolvidos, uma vez que diversos estímulos inflamatórios são capazes de aumentar a liberação de glutamato/impedir o funcionamento do mecanismo de recaptação nas células microgliais, como ROS, TNF- α e IL-1 β (Domercq *et al.*, 2007). Mais estudos são necessários para determinar se na LID, o aumento de glutamato envolve a participação microglial e quais fatores poderiam estar envolvidos nesta produção.

Os papéis das cascatas de sinalização dos receptores TLR2 e P2X7 em resposta à ativação por α -sin têm sido amplamente investigados em diferentes modelos experimentais de estresse oxidativo e neuroinflamação. Estudos recentes demonstraram que a estimulação de ambos os receptores ativa a via PI3K/AKT não apenas em células microgliais, mas também em macrófagos derivados da medula óssea e células dendríticas mieloides (Jiang *et al.*, 2015; Schmitz *et al.*, 2008) e que uma sinalização anormal desta cascata tem sido associada à

ativação da NADPH-oxidase (Brennan-Minnella *et al.*, 2013) e à DP (Timmons *et al.*, 2009). Em relação aos efeitos induzidos por α -sin_f nas células microgлияis, ambos os receptores foram críticos para aumentar a liberação de glutamato. Também demonstramos que estes receptores agem em conjunto, compartilhando um mecanismo similar, resultando na fosforilação de AKT. Não podemos descartar, entretanto, a possibilidade de que parte da α -sin_f possa ser englobada pelas células microgлияis. No entanto, é improvável que nossos efeitos estejam relacionados à α -sin_f intracelular, uma vez que a liberação de glutamato foi completamente abolida pela associação de antagonistas de P2X7 e TLR2.

A fosforilação de AKT pode levar à superprodução de ROS e à supressão de enzimas antioxidantes (Jin *et al.*, 2014; Los *et al.*, 2009), processo acreditado de resultar no estresse oxidativo que exacerba a neurodegeneração na DP (Ho *et al.*, 2012; Jenner, 2003; Rojanathammanee *et al.*, 2011), embora resultados conflitantes tenham sido descritos (Newsholme *et al.*, 2007; Okoh *et al.*, 2013). Uma fonte potencial de ROS na SNpc é a micrógлия ativada, que é comumente observada no encéfalo de pacientes com DP (Jenner, 2003) causando aumento da produção de ROS e morte de neurônios dopaminérgicos (Diogenes *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2009; Wilkaniec *et al.*, 2013). Relatos na literatura indicam que a ativação de diferentes enzimas, como a NOX2, leva a um quadro neurotóxico, não só através da produção de ROS extracelular - que danificam os neurônios próximos - mas também pelo início da sinalização redox na micrógлия que amplifica a resposta pró-inflamatória (Del Bel *et al.*, 2016; Surace e Block, 2012). Aqui, demonstramos que o estresse oxidativo induzido por α -sin_f é um fator determinante para o glutamato liberado pelas células microgлияis.

As células microgлияis parecem ser a principal célula glial envolvida no aumento do glutamato na matriz extracelular descrita na DP, já que um efeito semelhante não foi encontrado nos astrócitos expostos à α -sin_f. Surpreendentemente, este achado se opõe aos dados encontrados para a LID, onde o estímulo com glutamato só foi capaz de alterar o funcionamento de astrócitos com relação à produção de citocinas. Enquanto os astrócitos são considerados um tipo benéfico de glia e tem sido classicamente suposto ter um papel neuroprotetor no encéfalo devido à sua capacidade de extinguir os radicais livres, regular a depuração de neurotransmissores e secretar fatores neurotróficos, as células microgлияis são consideradas do tipo prejudicial, e acredita-se que desempenha um papel crítico na neuroinflamação e nos danos neuronais (Mena e Yébenes, 2008). Corroborando esta hipótese, Takaki *et al.* (2012) demonstraram que o glutamato liberado por culturas primárias de células

microgliais sob a estimulação do agente inflamatório LPS reduziu a expressão de EAAT1 em astrócitos, prejudicando a depuração adequada do glutamato por essas células.

Também é importante citar que não somente as células microgliais ativadas demonstraram liberar glutamato, como também as células microgliais quiescentes (Domercq *et al.*, 2007). No entanto, o glutamato liberado pela micróglia quiescente é removido rápida e eficientemente por transportadores de aminoácidos excitatórios em outras células gliais, principalmente astrócitos (Domercq *et al.*, 1999). Observamos níveis relativamente baixos de glutamato em células não tratadas, enquanto sob estimulação de α -sin_f esses níveis foram 5 a 6 vezes maiores, o que indica sua ação como ativador de células microgliais. Para corroborar isso, a análise da morfologia celular também indicou que as células tratadas com α -sin_f eram morfológicamente diferentes das células não tratadas e continham níveis mais elevados do marcador inflamatório Iba-1. Embora tenhamos trabalhado com células microgliais praticamente purificadas em nossas condições experimentais, é possível associar os baixos níveis de glutamato a um sistema de depuração de glutamato mais eficiente que pode ser prejudicado pela sinalização de α -sin_f, ativando a produção de ROS e aumentando o funcionamento do transportador xCT.

A liberação de glutamato por células microgliais, normalmente aumentada em situação patológica e encontrada aqui aumentada pela exposição à α -sin_f, ocorre juntamente à troca de cistina através do transportador de glutamato/cistina xCT e pode desencadear a neurodegeneração devido a processos citotóxicos induzidos por glutamato, como sugerido por Conrad e Sato (2012). Este mecanismo é o mais eficiente em células microgliais para internalizar a cistina, que é convertida intracelularmente em cisteína, o substrato limitante na síntese de glutathione (Bridges *et al.*, 2012; Domercq *et al.*, 2013). Como a micróglia ativada produz espécies reativas de oxigênio (ROS), que está altamente presente no encéfalo com DP (Blesa *et al.*, 2015; Islam, 2017), é possível que estes encéfalos estejam sob estresse oxidativo severo e a glutathione serviria como um mecanismo de defesa, sendo um dos principais mecanismos celulares com ação antioxidante (Domercq *et al.*, 2013).

Nossos dados sugerem que as células microgliais podem cooperar na toxicidade típica da DP, acumulando glutamato na matriz extracelular e que parte dela ocorre como consequência do aumento no funcionamento do sistema xCT, sem afetar necessariamente a expressão do transportador. De modo importante, a ativação de células microgliais também induz a liberação de fatores inflamatórios, como ROS, IL-1 β , TNF- α , entre outros, que

prejudicam a função de EAATs, resultando em um aumento nos níveis extracelulares de glutamato (Domercq *et al.*, 2007). Embora tenhamos provado que, de fato, a exposição de células microgliais à α -sin_f induz uma liberação substancial de glutamato prevenida pelo inibidor de xCT sulfasalazina, não podemos excluir o envolvimento de diferentes mecanismos que podem levar a níveis aumentados de glutamato extracelular.

DA - papel de proteção nas células microgliais:

Nossos dados prévios demonstraram que, em culturas purificadas de astrócitos e micróglia, a L-DOPA e a DA poderiam apresentar um papel protetor *per se*, reduzindo a ativação dessas células e a produção de citocinas e glutamato (ver seção Resultados, capítulo 3). Baseado nisso, hipotetizamos que a DA poderia ser importante no controle da toxicidade da α -sin_f e que sua ausência, como no caso da DP, poderia resultar em alterações importantes na manifestação neuroquímica da doença.

Uma manutenção precisa dos níveis de DA e/ou a interação resultante do neurotransmissor a seu receptor é fundamental para a função cerebral. A ausência deste neurotransmissor resulta em complicações motoras classicamente associadas à DP, juntamente com possíveis disfunções neuroquímicas que podem estar relacionadas a esta progressão da doença. Na DP, há uma perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc que leva a um desequilíbrio nos níveis de DA na via nigroestriatal. Nesta parte do trabalho, indicamos que DA possui um papel protetor sólido para células microgliais expostas a α -sin_f e que a falta de DA é um fator crucial para a α -sin_f produzir os efeitos descritos sobre células microgliais. Contraditoriamente, o oposto é acreditado na LID, onde o aumento de L-DOPA seria responsável pela ativação da transmissão glutamatérgica corticoestriatal e indução de um processo neuroinflamatório característico do estriado lesionado.

O impacto da falta de DA no encéfalo com DP e sua conexão com o sistema glutamatérgico foi demonstrado em relatos anteriores. Estudos *in vitro* demonstraram que os agonistas de receptores DA inibem a liberação de glutamato evocada por potássio a partir de fatias estriatais (Mitchell e Doggett, 1980; Rowlands e Roberts, 1980) e de sinaptossomas no estriado (Godukhin *et al.*, 1984; Maura *et al.*, 1988). Além disso, Morari *et al.* (1998) em seu trabalho confirmaram por experimentos *in vitro* e *in vivo* nas áreas dopaminérgicas do estriado e do mesencéfalo representam principalmente a DA como um modulador inibitório da liberação de glutamato. Por outro lado, diversos estudos apontam um aumento na comunicação glutamatérgica no estriado de roedores tratados cronicamente com L-DOPA

(Ahmed *et al.* 2011; Farber e Kettenmann, 2005; Huot *et al.* 2013; Morin e Di Paolo 2014; Rylander *et al.* 2009). Por fim, há uma falta de estudos que investigue os efeitos da DA na liberação de glutamato em células microgliais.

Os efeitos benéficos de DA em células microgliais podem estar relacionados à sua propriedade antioxidante. O atributo antioxidante da DA e outras catecolaminas foram sugeridos com base em experiências *in vitro* sobre linhas celulares neuronais (Colamartino *et al.*, 2012; Iacovitti *et al.*, 1999; Noh *et al.*, 1999; Troadec *et al.*, 2001) e células sanguíneas (Cornetta *et al.*, 2009; Cosentino *et al.*, 2004). Em nosso modelo microglial cultivado, a DA atuou como um inibidor robusto da produção de NOX2 e ROS em células microgliais, o que poderia explicar a modulação da liberação de glutamato. É impossível garantir, no entanto, se a propriedade antioxidante da DA é o principal mecanismo pelo qual a DA exerce suas ações benéficas em células microgliais ou se é parte de uma modulação neuroquímica mais complexa que resulta no papel protetor desse neurotransmissor.

A DA também pode exercer um papel neuroprotetor através de mecanismos dependentes de receptor (Kitamura *et al.*, 2002; Schapira, 2002). Vários estudos sustentam a hipótese de um papel neuroprotetor putativo de DA via D2R, mais que receptores D1R, como mediadores desta ação. Por exemplo, a maioria dos trabalhos sugere o D2R como a principal via dopaminérgica para diminuir a fosforilação de AKT (Beaulieu *et al.*, 2004), que descobrimos aumentada após exposição à α -sin_f em nosso modelo experimental. Em oposição, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram uma ativação de AKT e subsequente inibição de GSK3 após a estimulação com DA (Beaulieu *et al.*, 2011; Brami-Cherrier *et al.*, 2002; Svenningsson *et al.*, 2003; Mannoury La Cour *Et al.*, 2011; Rau *et al.*, 2011). Além disso, a DA mostrou proteger os neurônios estriatais contra a morte celular induzida pelo glutamato possivelmente através da sinalização mediada por D1 (Amano *et al.*, 1994). Aqui descobrimos que, em células microgliais, D1R, mas não D2R, é necessário para aumentar o glutamato e que esse aumento pode estar relacionado à ativação de AKT.

O mecanismo de D1R para aumentar o glutamato não é completamente dependente da síntese de AMPc. Alguns estudos revelaram que os receptores de DA podem exercer algumas de suas funções neuroquímicas através de vias de sinalização alternativos que podem não envolver esse segundo mensageiro (Beaulieu *et al.*, 2004; 2005; Hasbi *et al.*, 2009). Por exemplo, existem fortes evidências de que os receptores de DA podem regular a ERK 1/2 (Beom *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2006; Wang C *et al.*, 2005) e ativar

mecanismos independentes de AMPc que envolvem a proteína adaptadora multifuncional beta-arrestina 2 (Beaulieu *et al.*, 2004; 2005), o que indiretamente resulta na formação de uma sinalização complexa que leva à ativação de várias cascatas de sinalização intracelulares independentes de proteína G, incluindo a via AKT/GSK3 (Beaulieu *et al.*, 2004, 2005; Luttrell e Gesty-Palmer, 2010; Luttrell *et al.*, 1999). Também foi demonstrado que D1R e D2R transativam o receptor do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em neurônios (Swift *et al.*, 2011). Finalmente, esses dois receptores são capazes de modular a internalização de canais de cálcio através da interação proteína-proteína *in vivo* (Kisilevsky e Zamponi, 2008; Kisilevsky *et al.*, 2008). Corroborando esses dados, nossos resultados indicam que o AMPc não pode explicar completamente os efeitos da DA, sugerindo diferentes mecanismos que poderiam estar envolvidos no processo de liberação de glutamato. Estudos adicionais são necessários para explicar a cascata de sinalização através da qual a DA produz seus efeitos protetores.

Conclusão:

Aqui, propusemos que as células microgliais podem ser um contribuinte essencial para a excitotoxicidade dependente do glutamato encontrada na DP. Os dados apresentados sugerem que o α -sin_f pode participar da progressão da DP promovendo um acúmulo tóxico de glutamato extracelular associado a um processo de estresse excitotóxico. Mais interessante, o neurotransmissor DA aboliu totalmente a indução da liberação de glutamato induzida por α -sin_f através de um efeito antioxidante e inibição da sinalização PI3K. O déficit em DA que caracteriza a DP pode amplificar esse processo em um mecanismo de círculo vicioso.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

7. MATERIAL SUPLEMENTAR:

Material Suplementar 1: Análise comportamental para identificação da intensidade da lesão. (A) Comportamento rotatório induzido por apomorfina. As colunas representam o número de rotações contralaterais à lesão durante 45 minutos após a administração de apomorfina (0,5 mg/kg s.c.). A divisão dos grupos apontam que todos tiveram um aumento na rotação significativo em relação ao grupo sem lesão, mas não obtiveram diferença estatística no número de rotações entre si. (B) Quantificação do uso assimétrico da pata dianteira após lesão com 6-OHDA: os animais, aproximadamente 3 semanas após a injeção unilateral com 6-OHDA, foram expostos a um aparato cilíndrico por 5 minutos e o número de vezes em que se apoiaram no cilindro foi quantificado. Os grupos de 1 a 5 tiveram uma redução significativa no uso da pata contralateral à lesão em relação ao grupo controle. O resultado foi expresso em (número de usos da pata ipsilateral ou contralateral/número de uso total das patas dianteiras) x 100. * $p < 0,05$ vs. sham (A: ANOVA de uma via seguida por Bonferroni; B: ANOVA de duas vias; $n = 7$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Material Suplementar 2: Colocalização de COX-2 estriatal com neurônios (NeuN) no estriado lesionado de camundongos tratados cronicamente com L-DOPA visualizada pela técnica de imunohistoquímica colorimétrica. (A) O esquema demonstra a área dorsolateral, utilizada para microfotografias do estriado lesionado. (B) A fotomicrografia apresenta a marcação para NeuN (castanho) juntamente à COX-2 (azul) no estriado lesionado. As setas apontam a presença dos tipos celulares com colocalização. Aumento: 40x.

Material Suplementar 3: Fotomicrografias representativas da expressão de GFAP na área dorsolateral do estriado. (A) Os animais lesionados tratados com salina por 21 dias apresentam marcação pouco visível no estriado dorsolateral rostral, medial e caudal. (B) O tratamento com L-DOPA aumentou expressivamente a marcação para GFAP no estriado rostral preferencialmente na área dorsolateral, onde há maior perda dopaminérgica.

Material Suplementar 4: Análise do efeito do LPS sobre a ativação de astrócitos. (A) Western blots representativos para GFAP (55 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (B) A quantificação de GFAP em culturas primárias de astrócitos indicou um aumento da expressão desta proteína após o tratamento com LPS. (C) O LPS não alterou a liberação de LDH no meio extracelular. (D) O tratamento com LPS aumentou robustamente a produção da citocina TNF-α, assim como de (E) IL-1β e (E) IL-6. (F) A liberação de glutamato não foi modificada nos astrócitos em resposta ao tratamento com LPS. * $p < 0,05$ vs. controle (-) (Student test t não-pareado. B-C: $n = 4$ /grupo; C-G: $n = 6-8$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. ND: Não-detectável.

Material Suplementar 5: Análise do efeito do LPS sobre a ativação de micróglia. (A) Western blots representativos para Iba-1 (17 kDa) e GADPH (37 kDa, controle). (B) A quantificação de Iba-1 em culturas primárias microgliais indicou um aumento da expressão desta proteína após o tratamento com LPS. (C) O LPS não alterou a liberação de LDH no meio extracelular. (D) O tratamento com LPS aumentou robustamente a produção da citocina TNF- α , assim como de (E) IL-1 β e (E) IL-6. (F) A liberação de glutamato também foi aumentada pelas células microgliais em resposta ao tratamento com LPS. * $p < 0,05$ vs. controle (-) (Student test t não-pareado. B-C: $n = 4$ /grupo; C-G: $n = 6-8$ /grupo). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM. ND: Não-detectável.

Material Suplementar 6: Desenvolvimento de AIM em camundongos lesionados 6-OHDA após tratamento crônico com L-DOPA. (A) L-DOPA foi administrado em ratinhos 6-OHDA durante 21 dias. O tratamento crônico com LDOPA induziu um desenvolvimento de AIMs axiais, membros e orofaciais. (B) Apesar de induzir um comportamento rotatório moderado em camundongos, o tratamento com L-DOPA não aumentou o comportamento rotacional ao longo do tempo. * $p < 0,05$ vs. primeiro dia de tratamento (Friedman seguido por Wilcoxon, $n = 8/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de mediana $\pm$ intervalo interquartil.

Material Suplementar 7: Efeito de CPZ+CBD na atividade locomotora de camundongos lesionados com 6-OHDA e tratados com L-DOPA. (A) O tempo de imobilidade foi medido somente nos camundongos 6-OHDA, Vei/L-DOPA e CPZ+CBD/L-DOPA. A L-DOPA reduziu significativamente a imobilidade em camundongos lesionados com 6-OHDA e CPZ+CBD não modificou o efeito da L-DOPA. (B) Da mesma forma, L-DOPA melhorou a velocidade média dos camundongos do grupo Vei/L-DOPA e o pré-tratamento com CPZ+CBD não alterou o efeito da L-DOPA. * $p < 0,05$ vs. grupo 6-OHDA (-) (ANOVA de uma via seguida por Bonferroni, $n = 8/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Material Suplementar 8: Análise do efeito do Celec sobre a expressão de NF-κB no estriado lesionado de camundongos. (A) Western blots representativos de NF-κB estriatal (65 kDa) e α-tubulina (50 kDa, controle). (B) A quantificação da proteína NF-κB no estriado lesionado indicou um aumento na expressão de NF-κB após o tratamento com L-DOPA. O tratamento com Celec, no entanto, não resultou em uma alteração significativa neste fator de transcrição. * $p < 0,05$ (ANOVA de uma via seguida por Bonferroni, $n = 4/\text{grupo}$). Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

Material Suplementar 9: Efeito dos agentes inflamogênicos α -sin_f e LPS na liberação de glutamato em astrócitos. nas culturas primárias de astrócitos, foi possível observar que o tratamento com α -sin_f e LPS por 24h não foi eficaz em aumentar os níveis de glutamato extracelular. ANOVA de uma via seguida por Bonferroni, n = 6/grupo. Valores apresentados em forma de média $\pm$ EPM.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS:

- Adams, J., Collaco-Moraes, Y., de Belleruche, J. (1996) Cyclooxygenase-2 induction in cerebral cortex: an intracellular response to synaptic excitation. *Journal of neurochemistry*, 66, 6-13.
- Agid, Y. (1998) L-DOPA: is toxicity a myth? *Neurology*, 50, 858-863.
- Agid, Y., Blin, J. (1987) Nerve cell death in degenerative diseases of the central nervous system: clinical aspects. *Ciba Foundation symposium*, 126, 3-29.
- Ahlskog, J.E., Muentner, M.D. (2001) Frequency of L-DOPA-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 16, 448-458.
- Ahmed, I., Bose, S.K., Pavese, N., Ramlackhansingh, A., Turkheimer, F., Hotton, G., Hammers, A., Brooks, D.J. (2011) Glutamate NMDA receptor dysregulation in Parkinson's disease with dyskinesias. *Brain: a journal of neurology*, 134, 979-986.
- Aid, S., Bosetti, F. (2011) Targeting cyclooxygenases-1 and -2 in neuroinflammation: Therapeutic implications. *Biochimie*, 93, 46-51.
- Akaneya, Y., Tsumoto, T. (2006) Bidirectional trafficking of prostaglandin E2 receptors involved in long-term potentiation in visual cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 26, 10209-10221.
- Albin, R.L., Young, A.B., Penney, J.B. (1989) The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends in neurosciences*, 12, 366-375.
- Allan, S.M., Rothwell, N.J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 734-744.
- Allan, S.M., Rothwell, N.J. (2003) Inflammation in central nervous system injury. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 358, 1669-1677.
- Almer, G., Guegan, C., Teismann, P., Naini, A., Rosoklija, G., Hays, A.P., Chen, C., Przedborski, S. (2001) Increased expression of the pro-inflammatory enzyme cyclooxygenase-2 in amyotrophic lateral sclerosis. *Annals of neurology*, 49, 176-185.
- Amano, T., Ujihara, H., Matsubayashi, H., Sasa, M., Yokota, T., Tamura, Y., Akaike, A. (1994) Dopamine-induced protection of striatal neurons against kainate receptor-mediated glutamate cytotoxicity in vitro. *Brain research*, 655, 61-69.
- Amara, S.G., Arriza, J.L. (1993) Neurotransmitter transporters: three distinct gene families. *Current opinion in neurobiology*, 3, 337-344.
- Amin, A.R., Attur, M.G., Thakker, G.D., Patel, P.D., Vyas, P.R., Patel, R.N., Patel, I.R., Abramson, S.B. (1996) A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 14014-14019.
- Andersson, M., Hilbertson, A., Cenci, M.A. (1999) Striatal fosB expression is causally linked with l-DOPA-induced abnormal involuntary movements and the associated upregulation of striatal prodynorphin mRNA in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 6, 461-474.
- Andersson, M., Konradi, C., Cenci, M.A. (2001) cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the

dopamine-denervated striatum. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21, 9930-9943.

Andersson, M., Westin, J.E., Cenci, M.A. (2003) Time course of striatal DeltaFosB-like immunoreactivity and prodynorphin mRNA levels after discontinuation of chronic dopaminomimetic treatment. *The European journal of neuroscience*, 17, 661-666.

Andreasson, K.I., Savonenko, A., Vidensky, S., Goellner, J.J., Zhang, Y., Shaffer, A., Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Isakson, P., Markowska, A.L. (2001) Age-dependent cognitive deficits and neuronal apoptosis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 21, 8198-8209.

Aquino, C.C., Fox, S.H. (2015) Clinical spectrum of L-DOPA-induced complications. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 30, 80-89.

Areal, L.B., Rodrigues, L.C., Andrich, F., Moraes, L.S., Cicilini, M.A., Mendonca, J.B., Pelicao, F.S., Nakamura-Palacios, E.M., Martins-Silva, C., Pires, R.G. (2015) Behavioural, biochemical and molecular changes induced by chronic crack-cocaine inhalation in mice: The role of dopaminergic and endocannabinoid systems in the prefrontal cortex. *Behavioural brain research*, 290, 8-16.

Ashton, J.C. (2007) Cannabinoids for the treatment of inflammation. *Current opinion in investigational drugs*, 8, 373-384.

Attwell, D., Buchan, A.M., Charpak, S., Lauritzen, M., Macvicar, B.A., Newman, E.A. (2010) Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature*, 468, 232-243.

Aubert, G. (2005) Charcot revisited: the case of Bruegel's chorea. *Archives of neurology*, 62, 155-161.

Aubert, I., Guigoni, C., Hakansson, K., Li, Q., Dovero, S., Barthe, N., Bioulac, B.H., Gross, C.E., Fisone, G., Bloch, B., Bezard, E. (2005) Increased D1 dopamine receptor signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *Annals of neurology*, 57, 17-26.

Aubin, N., Curet, O., Deffois, A., Carter, C. (1998) Aspirin and salicylate protect against MPTP-induced dopamine depletion in mice. *Journal of neurochemistry*, 71, 1635-1642.

Baldwin, A.S., Jr. (1996) The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annual review of immunology*, 14, 649-683.

Barbiero, J.K., Santiago, R., Tonin, F.S., Boschen, S., da Silva, L.M., Werner, M.F., da Cunha, C., Lima, M.M., Vital, M.A. (2014a) PPAR-alpha agonist fenofibrate protects against the damaging effects of MPTP in a rat model of Parkinson's disease. *Progress in neuro-psychopharmacology, biological psychiatry*, 53, 35-44.

Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Persike, D.S., da Silva Fernandes, M.J., Tonin, F.S., da Cunha, C., Lucio Boschen, S., Lima, M.M., Vital, M.A. (2014b) Neuroprotective effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists in model of parkinsonism induced by intranigral 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Behavioural brain research*, 274, 390-399.

Barger, S.W., Goodwin, M.E., Porter, M.M., Beggs, M.L. (2007) Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry*, 101, 1205-1213.

Barish, G.D. (2006) Peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptors in atherosclerosis and immunity. *The Journal of nutrition*, 136, 690-694.

Barker, R.A., Dunnett, S.B., Faissner, A., Fawcett, J.W. (1996) The time course of loss of dopaminergic neurons and the gliotic reaction surrounding grafts of embryonic mesencephalon to the striatum. *Experimental neurology*, 141, 79-93.

Barnum, C.J., Eskow, K.L., Dupre, K., Blandino, P., Jr., Deak, T., Bishop, C. (2008) Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: role for interleukin-1beta. *Neuroscience*, 156, 30-41.

Bartels, A.L., Leenders, K.L. (2007) Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: evidence from animal models to human in vivo studies with [11C]-PK11195 PET. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 22, 1852-1856.

Barzilai, A., Daily, D., Zilkha-Falb, R., Ziv, I., Offen, D., Melamed, E., Shirvan, A. (2003) The molecular mechanisms of dopamine toxicity. *Advances in neurology*, 91, 73-82.

Barzilai, A., Melamed, E., Shirvan, A. (2001) Is there a rationale for neuroprotection against dopamine toxicity in Parkinson's disease? *Cellular and molecular neurobiology*, 21, 215-235.

Basma, A.N., Morris, E.J., Nicklas, W.J., Geller, H.M. (1995) L-dopa cytotoxicity to PC12 cells in culture is via its autoxidation. *Journal of neurochemistry*, 64, 825-832.

Batlouni, M. (2010) [Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cardiovascular, cerebrovascular and renal effects]. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 94, 556-563.

Baune, B.T., Wiede, F., Braun, A., Golledge, J., Arolt, V., Koerner, H. (2008) Cognitive dysfunction in mice deficient for TNF- and its receptors. *American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics: the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics*, 147B, 1056-1064.

Bazan, N.G., Allan, G. (1996) Platelet-activating factor is both a modulator of synaptic function and a mediator of cerebral injury and inflammation. *Advances in neurology*, 71, 475-482, discussion 482-474.

Bear, M., Connors, B.W., Paradiso, M. (2002) *Exploring the brain*. 2nd edition - Editora Artmed - Porto Alegre.

Beaulieu, J.M., Del'guidice, T., Sotnikova, T.D., Lemasson, M., Gainetdinov, R.R. (2011) Beyond cAMP: The Regulation of Akt and GSK3 by Dopamine Receptors. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4, 38.

Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Marion, S., Lefkowitz, R.J., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2005) An Akt/beta-arrestin 2/PP2A signaling complex mediates dopaminergic neurotransmission and behavior. *Cell*, 122, 261-273.

Beaulieu, J.M., Sotnikova, T.D., Yao, W.D., Kockeritz, L., Woodgett, J.R., Gainetdinov, R.R., Caron, M.G. (2004) Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 5099-5104.

Belin, D., Jonkman, S., Dickinson, A., Robbins, T.W., Everitt, B.J. (2009) Parallel and interactive learning processes within the basal ganglia: relevance for the understanding of addiction. *Behavioural brain research*, 199, 89-102.

Ben Haim, L., Carrillo-de Sauvage, M.A., Ceyzeriat, K., Escartin, C. (2015) Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontiers in cellular neuroscience*, 9, 278.

Benazzouz, A., Breit, S., Koudsie, A., Pollak, P., Krack, P., Benabid, A.L. (2002) Intraoperative microrecordings of the subthalamic nucleus in Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 17 Suppl 3, S145-149.

Beom, S., Cheong, D., Torres, G., Caron, M.G., Kim, K.M. (2004) Comparative studies of molecular mechanisms of dopamine D2 and D3 receptors for the activation of extracellular signal-regulated kinase. *The Journal of biological chemistry*, 279, 28304-28314.

Beraud, D., Hathaway, H.A., Trecki, J., Chasovskikh, S., Johnson, D.A., Johnson, J.A., Federoff, H.J., Shimoji, M., Mhyre, T.R., Maguire-Zeiss, K.A. (2013) Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 8, 94-117.

Bergman, H., Wichmann, T., Karmon, B., DeLong, M.R. (1994) The primate subthalamic nucleus. II. Neuronal activity in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology*, 72, 507-520.

Berman, S.B., Hastings, T.G. (1999) Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 73, 1127-1137.

Bernardo, A., Minghetti, L. (2008) Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma Natural and Synthetic Agonists. *PPAR research*, 2008, 864140.

Bernardo, A., Levi, G., Minghetti, L. (2000) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *The European journal of neuroscience*, 12, 2215-2223.

Betarbet, R., Sherer, T.B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A.V., Greenamyre, J.T. (2000) Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience*, 3, 1301-1306.

Bevan, M.D., Magill, P.J., Terman, D., Bolam, J.P., Wilson, C.J. (2002) Move to the rhythm: oscillations in the subthalamic nucleus-external globus pallidus network. *Trends in neurosciences*, 25, 525-531.

Bezard, E., Brotchie, J.M., Gross, C.E. (2001) Pathophysiology of L-DOPA-induced dyskinesia: potential for new therapies. *Nature reviews. Neuroscience*, 2, 577-588.

Bibbiani, F., Oh, J.D., Kielaitis, A., Collins, M.A., Smith, C., Chase, T.N. (2005) Combined blockade of AMPA and NMDA glutamate receptors reduces L-DOPA-induced motor complications in animal models of PD. *Experimental neurology*, 196, 422-429.

Bisogno, T., Hanus, L., De Petrocellis, L., Tchilibon, S., Ponde, D.E., Brandi, I., Moriello, A.S., Davis, J.B., Mechoulam, R., Di Marzo, V. (2001) Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *British journal of pharmacology*, 134, 845-852.

Blanchet, P.J., Gomez-Mancilla, B., Di Paolo, T., Bedard, P.J. (1995) Is striatal dopaminergic receptor imbalance responsible for L-DOPA-induced dyskinesia? *Fundamental, clinical pharmacology*, 9, 434-442.

Blanchet, P.J., Konitsiotis, S., Chase, T.N. (1998) Amantadine reduces L-DOPA-induced dyskinesias in parkinsonian monkeys. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 13, 798-802.

Blandini, F., Armentero, M.T., Fancellu, R., Blaugrund, E., Nappi, G. (2004) Neuroprotective effect of rasagiline in a rodent model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 187, 455-459.

Blesa, J., Trigo-Damas, I., Quiroga-Varela, A., Jackson-Lewis, V.R. (2015) Oxidative stress and Parkinson's disease. *Frontiers in neuroanatomy*, 9, 91.

Bliss, T.V., Collingridge, G.L. (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361, 31-39.

Bolam, J.P., Hanley, J.J., Booth, P.A., Bevan, M.D. (2000) Synaptic organisation of the basal ganglia. *Journal of anatomy*, 196 (Pt 4), 527-542.

Booz, G.W. (2011) Cannabidiol as an emergent therapeutic strategy for lessening the impact of inflammation on oxidative stress. *Free radical biology, medicine*, 51, 1054-1061.

Boraud, T., Bezard, E., Guehl, D., Bioulac, B., Gross, C. (1998) Effects of L-DOPA on neuronal activity of the globus pallidus externalis (GPe) and globus pallidus internalis (GPi) in the MPTP-treated monkey. *Brain research*, 787, 157-160.

Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F.E., da-Silva, C.A., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E. (2015a) Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 73, 377-387.

Bortolanza, M., Padovan-Neto, F.E., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Dos Santos-Pereira, M., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R., Del-Bel, E. (2015b) Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370.

Bouaboula, M., Hilairt, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G., Casellas, P. (2005) Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *European journal of pharmacology*, 517, 174-181.

Bozzi, Y., Borrelli, E. (2006) Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: what do D2 receptors have to do with it? *Trends in neurosciences*, 29, 167-174.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24, 197-211.

Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R.A., Jansen Steur, E.N., Braak, E. (2003) Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*, 24, 197-211.

Brami-Cherrier, K., Valjent, E., Garcia, M., Pages, C., Hipskind, R.A., Caboche, J. (2002) Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22, 8911-8921.

Breidert, T., Callebert, J., Heneka, M.T., Landreth, G., Launay, J.M., Hirsch, E.C. (2002) Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 82, 615-624.

Breit, S., Bouali-Benazzouz, R., Popa, R.C., Gasser, T., Benabid, A.L., Benazzouz, A. (2007) Effects of 6-hydroxydopamine-induced severe or partial lesion of the nigrostriatal pathway on the neuronal activity of pallido-subthalamic network in the rat. *Experimental neurology*, 205, 36-47.

Brennan-Minnella, A.M., Shen, Y., El-Benna, J., Swanson, R.A. (2013) Phosphoinositide 3-kinase couples NMDA receptors to superoxide release in excitotoxic neuronal death. *Cell death, disease*, 4, e580.

Bridges, R., Lutgen, V., Lobner, D., Baker, D.A. (2012) Thinking outside the cleft to understand synaptic activity: contribution of the cystine-glutamate antiporter (System xc-) to normal and pathological glutamatergic signaling. *Pharmacological reviews*, 64, 780-802.

Britch, S.C., Wiley, J.L., Yu, Z., Clowers, B.H., Craft, R.M. (2017) Cannabidiol-Delta9-tetrahydrocannabinol interactions on acute pain and locomotor activity. *Drug and alcohol dependence*, 175, 187-197.

Brown, T.M., Brotchie, J.M., Fitzjohn, S.M. (2003) Cannabinoids decrease corticostriatal synaptic transmission via an effect on glutamate uptake. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 11073-11077.

Buckingham, S.C., Campbell, S.L., Haas, B.R., Montana, V., Robel, S., Ogunrinu, T., Sontheimer, H. (2011) Glutamate release by primary brain tumors induces epileptic activity. *Nature medicine*, 17, 1269-1274.

Buffo, A., Rite, I., Tripathi, P., Lepier, A., Colak, D., Horn, A.P., Mori, T., Gotz, M. (2008) Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 3581-3586.

Burda, J.E., Sofroniew, M.V. (2014) Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81, 229-248.

Burstein, S. (2015) Cannabidiol (CBD) and its analogs: a review of their effects on inflammation. *Bioorganic, medicinal chemistry*, 23, 1377-1385.

Calabresi, P., Centonze, D., Gubellini, P., Pisani, A., Bernardi, G. (1998) Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. *The European journal of neuroscience*, 10, 3020-3023.

Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., Picconi, B. (2008) Molecular mechanisms underlying L-DOPA-induced dyskinesia. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 23 Suppl 3, S570-579.

Calabresi, P., Di Filippo, M., Ghiglieri, V., Tambasco, N., Picconi, B. (2010) L-DOPA-induced dyskinesias in patients with Parkinson's disease: filling the bench-to-bedside gap. *The Lancet. Neurology*, 9, 1106-1117.

Calabresi, P., Ghiglieri, V., Mazzocchi, P., Corbelli, I., Picconi, B. (2015) L-DOPA-induced plasticity: a double-edged sword in Parkinson's disease? *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 370.

Calabresi, P., Giacomini, P., Centonze, D., Bernardi, G. (2000) L-DOPA-induced dyskinesia: a pathological form of striatal synaptic plasticity? *Annals of neurology*, 47, S60-68, discussion S68-69.

Calon, F., Rajput, A.H., Hornykiewicz, O., Bedard, P.J., Di Paolo, T. (2003) L-DOPA-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 14, 404-416.

Campos, A.C., Fogaca, M.V., Sonogo, A.B., Guimaraes, F.S. (2016) Cannabidiol, neuroprotection and neuropsychiatric disorders. *Pharmacological research*, 112, 119-127.

Campos, A.C., Moreira, F.A., Gomes, F.V., Del Bel, E.A., Guimaraes, F.S. (2012) Multiple mechanisms involved in the large-spectrum therapeutic potential of cannabidiol in psychiatric disorders. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 367, 3364-3378.

Campos, A.C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Diaz-Alonso, J., Ortega-Gutierrez, S., Vazquez-Villa, H., Moreira, F.A., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Guimaraes, F.S. (2013) The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16, 1407-1419.

Campos, A.C., Ortega, Z., Palazuelos, J., Fogaca, M.V., Aguiar, D.C., Diaz-Alonso, J., Ortega-Gutierrez, S., Vazquez-Villa, H., Moreira, F.A., Guzman, M., Galve-Roperh, I., Guimaraes, F.S. (2013) The anxiolytic effect of cannabidiol on chronically stressed mice depends on hippocampal neurogenesis: involvement of the endocannabinoid system. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16, 1407-1419.

Carrasco, E., Casper, D., Werner, P. (2005) Dopaminergic neurotoxicity by 6-OHDA and MPP+: differential requirement for neuronal cyclooxygenase activity. *Journal of neuroscience research*, 81, 121-131.

Carroll, C.B., Bain, P.G., Teare, L., Liu, X., Joint, C., Wroath, C., Parkin, S.G., Fox, P., Wright, D., Hobart, J., Zajicek, J.P. (2004) Cannabis for dyskinesia in Parkinson disease: a randomized double-blind crossover study. *Neurology*, 63, 1245-1250.

Carta, A.R., Frau, L., Pisanu, A., Wardas, J., Spiga, S., Carboni, E. (2011) Rosiglitazone decreases peroxisome proliferator receptor-gamma levels in microglia and inhibits TNF-alpha production: new evidences on neuroprotection in a progressive Parkinson's disease model. *Neuroscience*, 194, 250-261.

Carta, M., Lindgren, H.S., Lundblad, M., Stancampiano, R., Fadda, F., Cenci, M.A. (2006) Role of striatal L-DOPA in the production of dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned rats. *Journal of neurochemistry*, 96, 1718-1727.

Carta, M., Tronci, E. (2014) Serotonin System Implication in l-DOPA-Induced Dyskinesia: From Animal Models to Clinical Investigations. *Frontiers in neurology*, 5, 78.

Carta, A.R., Mulas, G., Bortolanza, M., Duarte, T., Pillai, E., Fisone, G., Vozari, R.R., Del-Bel, E. (2017) l-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? *The European journal of neuroscience*, 45, 73-91.

Carvalho, W.A. (1990a) Mecanismos de ação das drogas anti-inflamatórias não-esteróides. I. Ações farmacológicas das prostaglandinas e leucotrienos. *F Med*, 100:37-44.

Carvalho, W.A. (1990b) Mecanismos de ação de drogas anti-inflamatórias não-esteróides. II. Ações analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas. *F Med*, 100:111-122.

Carvalho, W.A. (2002) Analgésicos, Antipiréticos e Anti-inflamatórios. *Farmacologia*, 6ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002,431-455.

Carvalho, W.A., Carvalho, R.D., Rios-Santos, F. (2004) [Specific cyclooxygenase-2 inhibitor analgesics: therapeutic advances.]. *Revista brasileira de anestesiologia*, 54, 448-464.

Carvalho, W.A., Lemonica, L. (2000) *Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. Temas de Anestesiologia. Curso de Graduação em Medicina*, 2ª Ed, São Paulo, Artes Médicas, 265-280.

Casarotto, P.C., Terzian, A.L., Aguiar, D.C., Zangrossi, H., Guimaraes, F.S., Wotjak, C.T., Moreira, F.A. (2012) Opposing roles for cannabinoid receptor type-1 (CB(1)) and transient receptor potential vanilloid type-1 channel (TRPV1) on the modulation of panic-like responses in rats. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 37, 478-486.

Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824.

Cenci, M.A., Lindgren, H.S. (2007) Advances in understanding L-DOPA-induced dyskinesia. *Current opinion in neurobiology*, 17, 665-671.

Cenci, M.A., Lundblad, M. (2006) Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*, 99, 381-392.

Cenci, M.A. (2007) L-DOPA-induced dyskinesia: cellular mechanisms and approaches to treatment. *Parkinsonism, related disorders*, 13 Suppl 3, S263-267.

Cenci, M.A. (2014) Presynaptic Mechanisms of l-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. *Frontiers in neurology*, 5, 242.

Cenci, M.A., Konradi, C. (2010) Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Progress in brain research*, 183, 209-233.

Cenci, M.A., Lee, C.S., Bjorklund, A. (1998) L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA. *The European journal of neuroscience*, 10, 2694-2706.

Cenci, M.A., Lundblad, M. (2006) Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. *Journal of neurochemistry*, 99, 381-392.

Cenci, M.A., Ohlin, K.E., Rylander, D. (2009) Plastic effects of L-DOPA treatment in the basal ganglia and their relevance to the development of dyskinesia. *Parkinsonism, related disorders*, 15 Suppl 3, S59-63.

Cenci, M.A., Tranberg, A., Andersson, M., Hilbertson, A. (1999) Changes in the regional and compartmental distribution of FosB- and JunB-like immunoreactivity induced in the dopamine-denervated rat striatum by acute or chronic L-dopa treatment. *Neuroscience*, 94, 515-527.

Chae, H.J., Chae, S.W., Reed, J.C., Kim, H.R. (2004) Salicylate regulates COX-2 expression through ERK and subsequent NF-kappaB activation in osteoblasts. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 26, 75-91.

Chagas, M.H., Zuardi, A.W., Tumas, V., Pena-Pereira, M.A., Sobreira, E.T., Bergamaschi, M.M., dos Santos, A.C., Teixeira, A.L., Hallak, J.E., Crippa, J.A. (2014) Effects of cannabidiol in the treatment of patients with Parkinson's disease: an exploratory double-blind trial. *Journal of psychopharmacology*, 28, 1088-1098.

Champy, P., Melot, A., Guérineau Eng, V., Gleye, C., Fall, D., Hoglinger, G.U., Ruberg, M., Lannuzel, A., Laprevote, O., Laurens, A., Hocquemiller, R. (2005) Quantification of acetogenins in *Annona muricata* linked to atypical parkinsonism in guadeloupe. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 20, 1629-1633.

Chandrasekharan, N.V., Dai, H., Roos, K.L., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S., Simmons, D.L. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 13926-13931.

Chang, J.Y., Liu, L.Z. (2000) Catecholamines inhibit microglial nitric oxide production. *Brain research bulletin*, 52, 525-530.

Chao, J., Nestler, E.J. (2004) Molecular neurobiology of drug addiction. *Annual review of medicine*, 55, 113-132.

Chase, T.N., Bibbiani, F., Oh, J.D. (2003) Striatal glutamatergic mechanisms and extrapyramidal movement disorders. *Neurotoxicity research*, 5, 139-146.

Chase, T.N., Oh, J.D. (2000a) Striatal dopamine- and glutamate-mediated dysregulation in experimental parkinsonism. *Trends in neurosciences*, 23, S86-91.

Chase, T.N., Oh, J.D. (2000b) Striatal mechanisms and pathogenesis of parkinsonian signs and motor complications. *Annals of neurology*, 47, S122-129, discussion S129-130.

Chen, C., Bazan, N.G. (2005) Endogenous PGE₂ regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Journal of neurophysiology*, 93, 929-941.

Chen, C., Magee, J.C., Bazan, N.G. (2002) Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E₂ signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. *Journal of neurophysiology*, 87, 2851-2857.

Chen, J., Rusnak, M., Luedtke, R.R., Sidhu, A. (2004) D1 dopamine receptor mediates dopamine-induced cytotoxicity via the ERK signal cascade. *The Journal of biological chemistry*, 279, 39317-39330.

Chen, N., Warner, J.L., Reiss, C.S. (2000) NSAID treatment suppresses VSV propagation in mouse CNS. *Virology*, 276, 44-51.

Chotibut, T., Meadows, S., Kasanga, E.A., McInnis, T., Cantu, M.A., Bishop, C., Salvatore, M.F. (2017) Ceftriaxone reduces L-dopa-induced dyskinesia severity in 6-hydroxydopamine parkinson's disease model. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*.

Citraro, R., Russo, E., Scicchitano, F., van Rijn, C.M., Cosco, D., Avagliano, C., Russo, R., D'Agostino, G., Petrosino, S., Guida, F., Gatta, L., van Luijckelaar, G., Maione, S., Di Marzo, V., Calignano, A., De Sarro, G. (2013) Antiepileptic action of N-palmitoylethanolamine through CB1 and PPAR- α receptor activation in a genetic model of absence epilepsy. *Neuropharmacology*, 69, 115-126.

Colamartino, M., Padua, L., Meneghini, C., Leone, S., Cornetta, T., Testa, A., Cozzi, R. (2012) Protective effects of L-dopa and carbidopa combined treatments on human catecholaminergic cells. *DNA and cell biology*, 31, 1572-1579.

Coleman, R.A., Smith, W.L., Narumiya, S. (1994) International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacological reviews*, 46, 205-229.

Collins, L.M., Williams-Gray, C.H. (2016) The Genetic Basis of Cognitive Impairment and Dementia in Parkinson's Disease. *Frontiers in psychiatry*, 7, 89.

Colville-Nash, P.R., Qureshi, S.S., Willis, D., Willoughby, D.A. (1998) Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *Journal of immunology*, 161, 978-984.

Comings, D.E. (2001) Clinical and molecular genetics of ADHD and Tourette syndrome. Two related polygenic disorders. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 931, 50-83.

Conrad, M., Sato, H. (2012) The oxidative stress-inducible cystine/glutamate antiporter, system x (c) (-) : cystine supplier and beyond. *Amino acids*, 42, 231-246.

Coogan, A.N., O'Leary, D.M., O'Connor, J.J. (1999) P42/44 MAP kinase inhibitor PD98059 attenuates multiple forms of synaptic plasticity in rat dentate gyrus in vitro. *Journal of neurophysiology*, 81, 103-110.

Cools, R., Lewis, S.J., Clark, L., Barker, R.A., Robbins, T.W. (2007) L-DOPA disrupts activity in the nucleus accumbens during reversal learning in Parkinson's disease. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 32, 180-189.

Cornetta, T., Palma, S., Aprile, I., Padua, L., Tonali, P., Testa, A., Cozzi, R. (2009) L-DOPA therapy reduces DNA damage in peripheral blood cells of patients with Parkinson's disease. *Cell biology and toxicology*, 25, 321-330.

Cosentino, M., Rasini, E., Colombo, C., Marino, F., Blandini, F., Ferrari, M., Samuele, A., Lecchini, S., Nappi, G., Frigo, G. (2004) Dopaminergic modulation of oxidative stress and apoptosis in human peripheral blood lymphocytes: evidence for a D1-like receptor-dependent protective effect. *Free radical biology, medicine*, 36, 1233-1240.

Cowley, T.R., Fahey, B., O'Mara, S.M. (2008) COX-2, but not COX-1, activity is necessary for the induction of perforant path long-term potentiation and spatial learning in vivo. *The European journal of neuroscience*, 27, 2999-3008.

Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V. (2006) Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience*, 139, 1405-1415.

Crofford, L.J. (1997) COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *The Journal of rheumatology. Supplement*, 49, 15-19.

Cryer, B., Dubois, A. (1998) The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase--a review. *Prostaglandins, other lipid mediators*, 56, 341-361.

Cunningham, C., Wilcockson, D.C., Champion, S., Lunnon, K., Perry, V.H. (2005) Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25, 9275-9284.

Dahlstrom, A., Fuxe, K. (1964) Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20, 398-399.

Daily, D., Barzilai, A., Offen, D., Kamsler, A., Melamed, E., Ziv, I. (1999) The involvement of p53 in dopamine-induced apoptosis of cerebellar granule neurons and leukemic cells overexpressing p53. *Cellular and molecular neurobiology*, 19, 261-276.

Daily, D., Vlamis-Gardikas, A., Offen, D., Mittelman, L., Melamed, E., Holmgren, A., Barzilai, A. (2001a) Glutaredoxin protects cerebellar granule neurons from dopamine-induced apoptosis by activating NF-kappa B via Ref-1. *The Journal of biological chemistry*, 276, 1335-1344.

Daily, L.Z., Lovett, M.C., Reder, L.M. (2001b) Modeling individual differences in working memory performance: a source activation account. *Cognitive science*, 25, 315-353.

Darmopil, S., Martin, A.B., De Diego, I.R., Ares, S., Moratalla, R. (2009) Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. *Biological psychiatry*, 66, 603-613.

Davis, S., Laroche, S. (1998) A molecular biological approach to synaptic plasticity and learning. *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie*, 321, 97-107.

De Pablo-Fernandez, E., Tur, C., Revesz, T., Lees, A.J., Holton, J.L., Warner, T.T. (2017) Association of Autonomic Dysfunction With Disease Progression and Survival in Parkinson Disease. *JAMA neurology*.

Del-Bel, E., Cavalcanti-Kwiatkoski, R., Padovan-Neto, F.E., Bortolanza, M., Raisman-Vozari, R. (2012) L-DOPA induced dyskinesia is associated with regional increase of cyclooxygenase 2. *Society for Neuroscience, New Orleans. Program Society for Neuroscience*.

Del-Bel, E., Bortolanza, M., Dos-Santos-Pereira, M., Bariotto, K., Raisman-Vozari, R. (2016) L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key elements? *Synapse*, 70, 479-500.

DeLong, M.R. (1990) Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. *Trends in neurosciences*, 13, 281-285.

DeLong, M.R., Wichmann, T. (2007) Circuits and circuit disorders of the basal ganglia. *Archives of neurology*, 64, 20-24.

Devinsky, O., Cilio, M.R., Cross, H., Fernandez-Ruiz, J., French, J., Hill, C., Katz, R., Di Marzo, V., Jutras-Aswad, D., Notcutt, W.G., Martinez-Orgado, J., Robson, P.J., Rohrback, B.G., Thiele, E., Whalley, B., Friedman, D. (2014) Cannabidiol: pharmacology and potential therapeutic role in epilepsy and other neuropsychiatric disorders. *Epilepsia*, 55, 791-802.

DeWitt, D.L., Smith, W.L. (1988) Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85, 1412-1416.

Dexter, D.T., Jenner, P. (2013) Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free radical biology, medicine*, 62, 132-144.

Di Filippo, M., Pini, L.A., Pelliccioli, G.P., Calabresi, P., Sarchielli, P. (2008) Abnormalities in the cerebrospinal fluid levels of endocannabinoids in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 79, 1224-1229.

Di Marzo, V., Blumberg, P.M., Szallasi, A. (2002) Endovanilloid signaling in pain. *Current opinion in neurobiology*, 12, 372-379.

Di Marzo, V., Hill, M.P., Bisogno, T., Crossman, A.R., Brothie, J.M. (2000) Enhanced levels of endogenous cannabinoids in the globus pallidus are associated with a reduction in movement in an animal model of Parkinson's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 14, 1432-1438.

Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T., De Petrocellis, L. (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends in neurosciences*, 21, 521-528.

Dickson, D.W. (2012) Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 2.

Diogenes, M.J., Dias, R.B., Rombo, D.M., Vicente Miranda, H., Maiolino, F., Guerreiro, P., Nasstrom, T., Franquelim, H.G., Oliveira, L.M., Castanho, M.A., Lannfelt, L., Bergstrom, J., Ingelsson, M., Quintas, A., Sebastiao, A.M., Lopes, L.V., Outeiro, T.F. (2012) Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32, 11750-11762.

Diz-Chaves, Y., Pernia, O., Carrero, P., Garcia-Segura, L.M. (2012) Prenatal stress causes alterations in the morphology of microglia and the inflammatory response of the hippocampus of adult female mice. *Journal of neuroinflammation*, 9, 71.

Dobbs, R.J., Charlett, A., Purkiss, A.G., Dobbs, S.M., Weller, C., Peterson, D.W. (1999) Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. *Acta neurologica Scandinavica*, 100, 34-41.

Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V., Areso, P., Matute, C. (1999) Expression of glutamate transporters in rat optic nerve oligodendrocytes. *The European journal of neuroscience*, 11, 2226-2236

Domercq, M., Sanchez-Gomez, M.V., Sherwin, C., Etxebarria, E., Fern, R., Matute, C. (2007) System xc- and glutamate transporter inhibition mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Journal of immunology*, 178, 6549-6556.

Domercq, M., Vazquez-Villoldo, N., Matute, C. (2013) Neurotransmitter signaling in the pathophysiology of microglia. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7, 49.

Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J.P., Biglan, K.M., Holloway, R.G., Kieburtz, K., Marshall, F.J., Ravina, B.M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C.M. (2007) Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. *Neurology*, 68, 384-386.

dos Santos Pereira, M., Sathler, M.F., Valli Tda, R., Marques, R.S., Ventura, A.L., Peccinalli, N.R., Fraga, M.C., Manhaes, A.C., Kubrusly, R. (2015) Long Withdrawal of Methylphenidate Induces a Differential Response of the Dopaminergic System and Increases Sensitivity to Cocaine in the Prefrontal Cortex of Spontaneously Hypertensive Rats. *PloS one*, 10, e0141249.

Dringen, R., Gutterer, J.M., Hirrlinger, J. (2000) Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *European journal of biochemistry*, 267, 4912-4916.

Du, H., Chen, X., Zhang, J., Chen, C. (2011) Inhibition of COX-2 expression by endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol is mediated via PPAR-gamma. *British journal of pharmacology*, 163, 1533-1549.

Dubois, R.N., Abramson, S.B., Crofford, L., Gupta, R.A., Simon, L.S., Van De Putte, L.B., Lipsky, P.E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12, 1063-1073.

Duda, J.E., Giasson, B.I., Mabon, M.E., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q. (2002) Novel antibodies to synuclein show abundant striatal pathology in Lewy body diseases. *Annals of neurology*, 52, 205-210.

El Manira, A., Kyriakatos, A. (2010) The role of endocannabinoid signaling in motor control. *Physiology*, 25, 230-238.

Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., Moisan, F. (2016) Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue neurologique*, 172, 14-26.

Elder, D.J., Halton, D.E., Playle, L.C., Paraskeva, C. (2002) The MEK/ERK pathway mediates COX-2-selective NSAID-induced apoptosis and induced COX-2 protein expression in colorectal carcinoma cells. *International journal of cancer*, 99, 323-327.

Ena, S., de Kerchove d'Exaerde, A., Schiffmann, S.N. (2011) Unraveling the differential functions and regulation of striatal neuron sub-populations in motor control, reward, and motivational processes. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 47.

Engber, T.M., Susel, Z., Juncos, J.L., Chase, T.N. (1989) Continuous and intermittent L-DOPA differentially affect rotation induced by D-1 and D-2 dopamine agonists. *European journal of pharmacology*, 168, 291-298.

English, J.D., Sweatt, J.D. (1997) A requirement for the mitogen-activated protein kinase cascade in hippocampal long term potentiation. *The Journal of biological chemistry*, 272, 19103-19106.

Eyo, U.B., Wu, L.J. (2013) Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain. *Neural plasticity*, 2013, 456857.

Fabbrini, G., Defazio, G., Colosimo, C., Suppa, A., Bloise, M., Berardelli, A. (2009) Onset and spread of dyskinesias and motor symptoms in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 24, 2091-2096.

Fahn, S., Parkinson Study, G. (2005) Does L-DOPA slow or hasten the rate of progression of Parkinson's disease? *Journal of neurology*, 252 Suppl 4, IV37-IV42.

Fakhfouri, G., Ahmadiani, A., Rahimian, R., Grolla, A.A., Moradi, F., Haeri, A. (2012) WIN55212-2 attenuates amyloid-beta-induced neuroinflammation in rats through activation of cannabinoid receptors and PPAR-gamma pathway. *Neuropharmacology*, 63, 653-666.

Farber, K., Kettenmann, H. (2005) Physiology of microglial cells. *Brain research. Brain research reviews*, 48, 133-143.

Farrand, A.Q., Gregory, R.A., Backman, C.M., Helke, K.L., Boger, H.A. (2016) Altered glutamate release in the dorsal striatum of the MitoPark mouse model of Parkinson's disease. *Brain research*, 1651, 88-94.

Fasano, S., Bezard, E., D'Antoni, A., Francardo, V., Indrigo, M., Qin, L., Dovero, S., Cerovic, M., Cenci, M.A., Brambilla, R. (2010) Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 21824-21829.

Feigin, A., Ghilardi, M.F., Carbon, M., Edwards, C., Fukuda, M., Dhawan, V., Margoulef, C., Ghez, C., Eidelberg, D. (2003) Effects of L-DOPA on motor sequence learning in Parkinson's disease. *Neurology*, 60, 1744-1749.

Feng, Z., Li, D., Fung, P.C., Pei, Z., Ramsden, D.B., Ho, S.L. (2003) COX-2-deficient mice are less prone to MPTP-neurotoxicity than wild-type mice. *Neuroreport*, 14, 1927-1929.

Feng, Z.H., Wang, T.G., Li, D.D., Fung, P., Wilson, B.C., Liu, B., Ali, S.F., Langenbach, R., Hong, J.S. (2002) Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to 1-methyl-4-phenyl 1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced damage of dopaminergic neurons in the substantia nigra. *Neuroscience letters*, 329, 354-358.

Fernandez-Ruiz, J. (2009) The endocannabinoid system as a target for the treatment of motor dysfunction. *British journal of pharmacology*, 156, 1029-1040.

Ferrari, C.C., Pott Godoy, M.C., Tarelli, R., Chertoff, M., Depino, A.M., Pitossi, F.J. (2006) Progressive neurodegeneration and motor disabilities induced by chronic expression of IL-1 β in the substantia nigra. *Neurobiology of disease*, 24, 183-193.

Ferrario, J.E., Delfino, M.A., Stefano, A.V., Zbarsky, V., Douhou, A., Murer, M.G., Raisman-Vozari, R., Gershanik, O.S. (2003) Effects of orally administered levodopa on mesencephalic dopaminergic neurons undergoing a degenerative process. *Neuroscience research*, 47, 431-436.

Ferreira, S.H., Vane, J.R. (1967) Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. *Nature*, 216, 868-873.

Feuerstein, C., Serre, F., Gavend, M., Pellat, J., Perret, J., Tanche, M. (1977) Plasma O-methyl dopa in L-DOPA-induced dyskinesias. A bioclinical investigation. *Acta neurologica Scandinavica*, 56, 508-524.

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. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 71.

Fierro, B., Piazza, A., Brighina, F., La Bua, V., Buffa, D., Oliveri, M. (2001) Modulation of intracortical inhibition induced by low- and high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation. *Experimental brain research*, 138, 452-457.

Filloux, F., Townsend, J.J. (1993) Pre- and postsynaptic neurotoxic effects of dopamine demonstrated by intrastriatal injection. *Experimental neurology*, 119, 79-88.

Findley, L.J. (2007) The economic impact of Parkinson's disease. *Parkinsonism, related disorders*, 13 Suppl, S8-S12.

Fisher, J.W., Gross, D.M., Foley, J.E., Nelson, P.K., Rodgers, G.M., George, W.J., Jubiz, W. (1978) A concept for the control of kidney production of erythropoietin involving prostaglandins and cyclic nucleotides. *Contributions to nephrology*, 13, 37-59.

Fitzgerald, M.L., Shobin, E., Pickel, V.M. (2012) Cannabinoid modulation of the dopaminergic circuitry: implications for limbic and striatal output. *Progress in neuro-psychopharmacology, biological psychiatry*, 38, 21-29.

Forno, L.S., DeLanney, L.E., Irwin, I., Di Monte, D., Langston, J.W. (1992) Astrocytes and Parkinson's disease. *Progress in brain research*, 94, 429-436.

Francardo, V., Cenci, M.A. (2014) Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. *Parkinsonism, related disorders*, 20 Suppl 1, S20-22.

Frankola, K.A., Greig, N.H., Luo, W., Tweedie, D. (2011) Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *CNS, neurological disorders drug targets*, 10, 391-403.

Gan, J., Qi, C., Liu, Z. (2015) Roles of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in subcellular expression of striatal N-methyl-D-aspartate receptors in 1-3, 4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinetic rats. *Drug design, development and therapy*, 9, 2119-2128.

Gao, H.M., Liu, B., Zhang, W., Hong, J.S. (2003) Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. *Trends in pharmacological sciences*, 24, 395-401.

Gao, X., Chen, H., Schwarzschild, M.A., Ascherio, A. (2011) Use of ibuprofen and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 76, 863-869.

Gasparini, C., Feldmann, M. (2012) NF-kappaB as a target for modulating inflammatory responses. *Current pharmaceutical design*, 18, 5735-5745.

Georgiev, D., Hamberg, K., Hariz, M., Forsgren, L., Hariz, G.M. (2017) Gender differences in Parkinson's disease: A clinical perspective. *Acta neurologica Scandinavica*.

Gerdeman, G., Lovinger, D.M. (2001) CB1 cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. *Journal of neurophysiology*, 85, 468-471.

Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma, F.J., Jr., Sibley, D.R. (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science*, 250, 1429-1432.

Gerfen, C.R., Surmeier, D.J. (2011) Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, 34, 441-466.

Gerfen, C.R., Wilson, C.J. (1996) *Handbook of Chemical Neuroanatomy: Chapter II – The Basal Ganglia*. Elsevier, 12, 306-314.

Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Mechoulam, R., Offen, D. (2003) The CB1 cannabinoid receptor agonist, HU-210, reduces L-DOPA-induced rotations in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Pharmacology, toxicology*, 93, 66-70.

Gillespie, W., Tyagi, N., Tyagi, S.C. (2011) Role of PPARgamma, a nuclear hormone receptor in neuroprotection. *Indian journal of biochemistry, biophysics*, 48, 73-81.

Gilroy, D.W., Colville-Nash, P.R., Willis, D., Chivers, J., Paul-Clark, M.J., Willoughby, D.A. (1999) Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nature medicine*, 5, 698-701.

Gilroy, D.W., Tomlinson, A., Willoughby, D.A. (1998) Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 47, 79-85.

Giuffrida, A., Parsons, L.H., Kerr, T.M., Rodriguez de Fonseca, F., Navarro, M., Piomelli, D. (1999) Dopamine activation of endogenous cannabinoid signaling in dorsal striatum. *Nature neuroscience*, 2, 358-363.

Glaser, S.T., Kaczocha, M. (2010) Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in the mouse brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 335, 380-388.

Glass, C.K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M.C., Gage, F.H. (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-934.

Godukhin, O.V., Zharikova, A.D., Budantsev, A. (1984) Role of presynaptic dopamine receptors in regulation of the glutamatergic neurotransmission in rat neostriatum. *Neuroscience*, 12, 377-383.

Gomes, F.V., Del Bel, E.A., Guimaraes, F.S. (2013) Cannabidiol attenuates catalepsy induced by distinct pharmacological mechanisms via 5-HT_{1A} receptor activation in mice. *Progress in neuro-psychopharmacology, biological psychiatry*, 46, 43-47.

Gomes, F.V., Llorente, R., Del Bel, E.A., Viveros, M.P., Lopez-Gallardo, M., Guimaraes, F.S. (2015) Decreased glial reactivity could be involved in the antipsychotic-like effect of cannabidiol. *Schizophrenia research*, 164, 155-163.

Gonçalves, L.L., Ramkissoon, A., Wells, P.G. (2009) Prostaglandin H synthase-1-catalyzed bioactivation of neurotransmitters, their precursors, and metabolites: oxidative DNA damage and electron spin resonance spectroscopy studies. *Chemical research in toxicology*, 22, 842-852.

Gonzalez-Aparicio, R., Moratalla, R. (2014) Oleoylethanolamide reduces L-DOPA-induced dyskinesia via TRPV1 receptor in a mouse model of Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 62, 416-425.

Goodarzi, Z., Ismail, Z. (2017) A practical approach to detection and treatment of depression in Parkinson disease and dementia. *Neurology. Clinical practice*, 7, 128-140.

Graham, D.G., Tiffany, S.M., Bell, W.R., Jr., Gutknecht, W.F. (1978) Autoxidation versus covalent binding of quinones as the mechanism of toxicity of dopamine, 6-hydroxydopamine, and related compounds toward C1300 neuroblastoma cells in vitro. *Molecular pharmacology*, 14, 644-653.

Graybiel, A.M. (2005) The basal ganglia: learning new tricks and loving it. *Current opinion in neurobiology*, 15, 638-644.

Graybiel, A.M., Aosaki, T., Flaherty, A.W., Kimura, M. (1994) The basal ganglia and adaptive motor control. *Science*, 265, 1826-1831.

Graziano, M.P., Casey, P.J., Gilman, A.G. (1987) Expression of cDNAs for G proteins in *Escherichia coli*. Two forms of Gs alpha stimulate adenylate cyclase. *The Journal of biological chemistry*, 262, 11375-11381.

Gupta, A., Dhir, A., Kumar, A., Kulkarni, S.K. (2009) Protective effect of cyclooxygenase (COX)-inhibitors against drug-induced catatonia and MPTP-induced striatal lesions in rats. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 94, 219-226.

Hadj Tahar, A., Gregoire, L., Darre, A., Belanger, N., Meltzer, L., Bedard, P.J. (2004) Effect of a selective glutamate antagonist on L-dopa-induced dyskinesias in drug-naïve parkinsonian monkeys. *Neurobiology of disease*, 15, 171-176.

Halliday, G.M., Stevens, C.H. (2011) Glia: initiators and progressors of pathology in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 26, 6-17.

Hardy, J. (2010) Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron*, 68, 201-206.

Hasbi, A., Fan, T., Alijaniam, M., Nguyen, T., Perreault, M.L., O'Dowd, B.F., George, S.R. (2009) Calcium signaling cascade links dopamine D1-D2 receptor heteromer to

striatal BDNF production and neuronal growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 21377-21382.

Hattori, A., Luo, Y., Umegaki, H., Munoz, J., Roth, G.S. (1998) Intrastriatal injection of dopamine results in DNA damage and apoptosis in rats. *Neuroreport*, 9, 2569-2572.

Hauber, W. (1998) Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. *Progress in neurobiology*, 56, 507-540.

Hawkey, C.J. (1999) COX-2 inhibitors. *Lancet*, 353, 307-314.

Hayden, M.S., Ghosh, S. (2014) Regulation of NF-kappaB by TNF family cytokines. *Seminars in immunology*, 26, 253-266.

Henry, V., Paille, V., Lelan, F., Brachet, P., Damier, P. (2009) Kinetics of microglial activation and degeneration of dopamine-containing neurons in a rat model of Parkinson disease induced by 6-hydroxydopamine. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 68, 1092-1102.

Hermann, H., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Schiano Moriello, A., Lutz, B., Di Marzo, V. (2003) Dual effect of cannabinoid CB1 receptor stimulation on a vanilloid VR1 receptor-mediated response. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 60, 607-616.

Hernandez-Romero, M.C., Delgado-Cortes, M.J., Sarmiento, M., de Pablos, R.M., Espinosa-Oliva, A.M., Arguelles, S., Bandez, M.J., Villaran, R.F., Maurino, R., Santiago, M., Venero, J.L., Herrera, A.J., Cano, J., Machado, A. (2012) Peripheral inflammation increases the deleterious effect of CNS inflammation on the nigrostriatal dopaminergic system. *Neurotoxicology*, 33, 347-360.

Hikosaka, O., Takikawa, Y., Kawagoe, R. (2000) Role of the basal ganglia in the control of purposive saccadic eye movements. *Physiological reviews*, 80, 953-978.

Hinz, B., Brune, K. (2002) Cyclooxygenase-2--10 years later. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 300, 367-375.

Hirsch, E.C., Breidert, T., Rousselet, E., Hunot, S., Hartmann, A., Michel, P.P. (2003) The role of glial reaction and inflammation in Parkinson's disease. *Annals of the New*

Hirsch, E.C., Hunot, S. (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *The Lancet. Neurology*, 8, 382-397.

Hirsch, E.C., Hunot, S., Damier, P., Faucheux, B. (1998) Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Annals of neurology*, 44, S115-120.

Ho, P.W., Ho, J.W., Liu, H.F., So, D.H., Tse, Z.H., Chan, K.H., Ramsden, D.B., Ho, S.L. (2012) Mitochondrial neuronal uncoupling proteins: a target for potential disease-modification in Parkinson's disease. *Translational neurodegeneration*, 1, 3.

Hornykiewicz, O. (1998) Biochemical aspects of Parkinson's disease. *Neurology*, 51, S2-9.

Hou, S.T., Cowan, E., Dostanic, S., Rasquinha, I., Comas, T., Morley, P., MacManus, J.P. (2001) Increased expression of the transcription factor E2F1 during dopamine-evoked, caspase-3-mediated apoptosis in rat cortical neurons. *Neuroscience letters*, 306, 153-156.

Hovelso, N., Sotty, F., Montezinho, L.P., Pinheiro, P.S., Herrik, K.F., Mork, A. (2012) Therapeutic potential of metabotropic glutamate receptor modulators. *Current neuropharmacology*, 10, 12-48.

Hu, P.J., Yu, J., Zeng, Z.R., Leung, W.K., Lin, H.L., Tang, B.D., Bai, A.H., Sung, J.J. (2004) Chemoprevention of gastric cancer by celecoxib in rats. *Gut*, 53, 195-200.

Huang, F., Cao, J., Liu, Q., Zou, Y., Li, H., Yin, T. (2013) MAPK/ERK signal pathway involved expression of COX-2 and VEGF by IL-1 β induced in human endometriosis stromal cells in vitro. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6, 2129-2136.

Hughes, A.J., Daniel, S.E., Lees, A.J. (1993) The clinical features of Parkinson's disease in 100 histologically proven cases. *Advances in neurology*, 60, 595-599.

Hull, M.H., Fiebich, B.L., Lieb, K. (2000) Strategies to delay the onset of Alzheimer's disease. *Exs*, 89, 211-225.

Hunot, S., Boissiere, F., Faucheux, B., Brugg, B., Mouatt-Prigent, A., Agid, Y., Hirsch, E.C. (1996) Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 72, 355-363.

Hunot, S., Vila, M., Teismann, P., Davis, R.J., Hirsch, E.C., Przedborski, S., Rakic, P., Flavell, R.A. (2004) JNK-mediated induction of cyclooxygenase 2 is required for neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 665-670.

Huot, P., Johnston, T.H., Koprach, J.B., Fox, S.H., Brothie, J.M. (2013) The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Pharmacological reviews*, 65, 171-222.

Hurley, S.D., Olschowka, J.A., O'Banion, M.K. (2002) Cyclooxygenase inhibition as a strategy to ameliorate brain injury. *Journal of neurotrauma*, 19, 1-15.

Hutchison, W.D., Allan, R.J., Opitz, H., Levy, R., Dostrovsky, J.O., Lang, A.E., Lozano, A.M. (1998) Neurophysiological identification of the subthalamic nucleus in surgery for Parkinson's disease. *Annals of neurology*, 44, 622-628.

Iacovitti, L., Stull, N.D., Mishizen, A. (1999) Neurotransmitters, KCl and antioxidants rescue striatal neurons from apoptotic cell death in culture. *Brain research*, 816, 276-285.

Iancu, R., Mohapel, P., Brundin, P., Paul, G. (2005) Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. *Behavioural brain research*, 162, 1-10.

Ikeda, H., Markey, C.J., Markey, S.P. (1992) Search for neurotoxins structurally related to 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Brain research*, 575, 285-298.

Islam, M.T. (2017) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders. *Neurological research*, 39, 73-82.

Issy, A.C., Salum, C., Del Bel, E.A. (2009) Nitric oxide modulation of methylphenidate-induced disruption of prepulse inhibition in Swiss mice. *Behavioural brain research*, 205, 475-481.

Ivanova, S.A., Loonen, A.J. (2016) L-DOPA-Induced Dyskinesia Is Related to Indirect Pathway Medium Spiny Neuron Excitotoxicity: A Hypothesis Based on an Unexpected Finding. *Parkinson's disease*, 2016, 6461907.

- Izzo, A.A., Borrelli, F., Capasso, R., Di Marzo, V., Mechoulam, R. (2009) Non-psychotropic plant cannabinoids: new therapeutic opportunities from an ancient herb. *Trends in pharmacological sciences*, 30, 515-527.
- Janeway, C.A., Jr. (2001) How the immune system protects the host from infection. *Microbes and infection*, 3, 1167-1171.
- Jankovic, J. (2008) Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 79, 368-376.
- Jellinger, K. (1987) Neuropathological substrates of Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 24, 109-129.
- Jellinger, K. (2012) Heterogenous mechanisms of mild cognitive impairment in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission*, 119, 381-382.
- Jenner, P. (2003) Dopamine agonists, receptor selectivity and dyskinesia induction in Parkinson's disease. *Current opinion in neurology*, 16 Suppl 1, S3-7.
- Jenner, P. (2008a) Dopamine agonists in Parkinson's disease--focus on non-motor symptoms. *European journal of neurology*, 15 Suppl 2, 1.
- Jenner, P. (2008b) Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature reviews. Neuroscience*, 9, 665-677.
- Jiang, C., Ting, A.T., Seed, B. (1998) PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 391, 82-86.
- Jiang, T., Hoekstra, J., Heng, X., Kang, W., Ding, J., Liu, J., Chen, S., Zhang, J. (2015) P2X7 receptor is critical in alpha-synuclein--mediated microglial NADPH oxidase activation. *Neurobiology of aging*, 36, 2304-2318.
- Jin, J., Shie, F.S., Liu, J., Wang, Y., Davis, J., Schantz, A.M., Montine, K.S., Montine, T.J., Zhang, J. (2007) Prostaglandin E2 receptor subtype 2 (EP2) regulates microglial activation and associated neurotoxicity induced by aggregated alpha-synuclein. *Journal of neuroinflammation*, 4, 2.
- Jin, S.Y., Lee, H.S., Kim, E.K., Ha, J.M., Kim, Y.W., Bae, S. (2014) Reactive oxygen species and PI3K/Akt signaling in cancer. *Free radical biology, medicine*, 75 Suppl 1, S34-35.
- Jing, L., He, Q., Zhang, J.Z. & Li, P.A. (2013) Temporal profile of astrocytes and changes of oligodendrocyte-based myelin following middle cerebral artery occlusion in diabetic and non-diabetic rats. *International journal of biological sciences*, 9, 190-199.
- Jouzeau, J.Y., Terlain, B., Abid, A., Nedelec, E., Netter, P. (1997) Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs*, 53, 563-582.
- Kaltschmidt, B., Kaltschmidt, C. (2015) NF-KappaB in Long-Term Memory and Structural Plasticity in the Adult Mammalian Brain. *Frontiers in molecular neuroscience*, 8, 69.
- Kapadia, R., Yi, J.H., Vemuganti, R. (2008) Mechanisms of anti-inflammatory and neuroprotective actions of PPAR-gamma agonists. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13, 1813-1826.
- Katzenschlager, R., Head, J., Schrag, A., Ben-Shlomo, Y., Evans, A., Lees, A.J., Parkinson's Disease Research Group of the United, K. (2008) Fourteen-year final report of the

randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. *Neurology*, 71, 474-480.

Kaufmann, W.E., Andreasson, K.I., Isakson, P.C., Worley, P.F. (1997) Cyclooxygenases and the central nervous system. *Prostaglandins*, 54, 601-624.

Kaufmann, W.E., Worley, P.F., Pegg, J., Bremer, M., Isakson, P. (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 2317-2321.

Kempster, P.A., O'Sullivan, S.S., Holton, J.L., Revesz, T., Lees, A.J. (2010) Relationships between age and late progression of Parkinson's disease: a clinico-pathological study. *Brain : a journal of neurology*, 133, 1755-1762.

Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P.A., Selvakumar, G.P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S.S., Zaheer, A. (2016) Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *Journal of neurology, neurosurgery and spine*, 1.

Kenborg, L., Lassen, C.F., Hansen, J., Olsen, J.H. (2012) Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders among welders: a Danish cohort study. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 27, 1283-1289.

Keshavan, M.S., Tandon, R., Boutros, N.N., Nasrallah, H.A. (2008) Schizophrenia, "just the facts": what we know in 2008 Part 3: neurobiology. *Schizophrenia research*, 106, 89-107.

Kim, C., Ho, D.H., Suk, J.E., You, S., Michael, S., Kang, J., Joong Lee, S., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H.J., Lee, S.J. (2013) Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nature communications*, 4, 1562.

Kim, D.S., Palmiter, R.D., Cummins, A., Gerfen, C.R. (2006) Reversal of supersensitive striatal dopamine D1 receptor signaling and extracellular signal-regulated kinase activity in dopamine-deficient mice. *Neuroscience*, 137, 1381-1388.

Kim, J., Alger, B.E. (2004) Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. *Nature neuroscience*, 7, 697-698.

Kisilevsky, A.E., Zamponi, G.W. (2008) D2 dopamine receptors interact directly with N-type calcium channels and regulate channel surface expression levels. *Channels*, 2, 269-277.

Kisilevsky, A.E., Mulligan, S.J., Altier, C., Iftinca, M.C., Varela, D., Tai, C., Chen, L., Hameed, S., Hamid, J., Macvicar, B.A., Zamponi, G.W. (2008) D1 receptors physically interact with N-type calcium channels to regulate channel distribution and dendritic calcium entry. *Neuron*, 58, 557-570.

Kitai, S.T., Deniau, J.M. (1981) Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. *Brain research*, 214, 411-415.

Kitamura, Y., Kakimura, J., Taniguchi, T. (2002) Antiparkinsonian drugs and their neuroprotective effects. *Biological, pharmaceutical bulletin*, 25, 284-290.

Knott, C., Stern, G., Wilkin, G.P. (2000) Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. *Molecular and cellular neurosciences*, 16, 724-739.

Kobylecki, C., Cenci, M.A., Crossman, A.R., Ravenscroft, P. (2010) Calcium-permeable AMPA receptors are involved in the induction and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 114, 499-511.

Konitsiotis, S., Blanchet, P.J., Verhagen, L., Lamers, E., Chase, T.N. (2000) AMPA receptor blockade improves L-DOPA-induced dyskinesia in MPTP monkeys. *Neurology*, 54, 1589-1595.

Konradi, C., Westin, J.E., Carta, M., Eaton, M.E., Kuter, K., Dekundy, A., Lundblad, M., Cenci, M.A. (2004) Transcriptome analysis in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia. *Neurobiology of disease*, 17, 219-236.

Kowal, S.L., Dall, T.M., Chakrabarti, R., Storm, M.V., Jain, A. (2013) The current and projected economic burden of Parkinson's disease in the United States. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 28, 311-318.

Krueger, J.M. (2008) The role of cytokines in sleep regulation. *Current pharmaceutical design*, 14, 3408-3416.

Kujubu, D.A., Fletcher, B.S., Varnum, B.C., Lim, R.W., Herschman, H.R. (1991) TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *The Journal of biological chemistry*, 266, 12866-12872.

Kulkarni, S.K., Jain, N.K., Singh, A. (2000) Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods and findings in experimental and clinical pharmacology*, 22, 291-298.

Kuno, R., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A. (2005) Autocrine activation of microglia by tumor necrosis factor-alpha. *Journal of neuroimmunology*, 162, 89-96.

Kurumbail, R.G., Stevens, A.M., Gierse, J.K., McDonald, J.J., Stegeman, R.A., Pak, J.Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J.M., Penning, T.D., Seibert, K., Isakson, P.C., Stallings, W.C. (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384, 644-648.

Lanahan, A., Worley, P. (1998) Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiology of learning and memory*, 70, 37-43.

Langston, J.W., Forno, L.S., Tetud, J., Reeves, A.G., Kaplan, J.A., Karluk, D. (1999) Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. *Annals of neurology*, 46, 598-605.

Lannuzel, A., Hoglinger, G.U., Champy, P., Michel, P.P., Hirsch, E.C., Ruberg, M. (2006) Is atypical parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *Journal of neural transmission. Supplementum*, 153-157.

Laprairie, R.B., Bagher, A.M., Kelly, M.E., Denovan-Wright, E.M. (2015) Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *British journal of pharmacology*, 172, 4790-4805.

Lastres-Becker, I., Molina-Holgado, F., Ramos, J.A., Mechoulam, R., Fernandez-Ruiz, J. (2005) Cannabinoids provide neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo and in vitro: relevance to Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 19, 96-107.

Lau, L.F., Nathans, D. (1987) Expression of a set of growth-related immediate early genes in BALB/c 3T3 cells: coordinate regulation with c-fos or c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 84, 1182-1186.

Lavoie, B., Parent, A. (1994) Pedunclopontine nucleus in the squirrel monkey: distribution of cholinergic and monoaminergic neurons in the mesopontine tegmentum with evidence for the presence of glutamate in cholinergic neurons. *The Journal of comparative neurology*, 344, 190-209.

Lawrence, T. (2009) The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 1, a001651.

Lee, H.J., Bae, E.J., Lee, S.J. (2014) Extracellular alpha-synuclein-a novel and crucial factor in Lewy body diseases. *Nature reviews. Neurology*, 10, 92-98.

Lee, H.J., Kim, S.H., Kim, K.W., Um, J.H., Lee, H.W., Chung, B.S., Kang, C.D. (2001) Antiapoptotic role of NF-kappaB in the auto-oxidized dopamine-induced apoptosis of PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, 76, 602-609.

Lehman, E.J., Hein, M.J., Baron, S.L., Gersic, C.M. (2012) Neurodegenerative causes of death among retired National Football League players. *Neurology*, 79, 1970-1974.

Leppert, D., Lindberg, R.L., Kappos, L., Leib, S.L. (2001) Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain research. Brain research reviews*, 36, 249-257.

Leweke, F.M., Piomelli, D., Pahlisch, F., Muhl, D., Gerth, C.W., Hoyer, C., Klosterkotter, J., Hellmich, M., Koethe, D. (2012) Cannabidiol enhances anandamide signaling and alleviates psychotic symptoms of schizophrenia. *Translational psychiatry*, 2, e94.

Liberatore, G.T., Jackson-Lewis, V., Vukosavic, S., Mandir, A.S., Vila, M., McAuliffe, W.G., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Przedborski, S. (1999) Inducible nitric oxide synthase stimulates dopaminergic neurodegeneration in the MPTP model of Parkinson disease. *Nature medicine*, 5, 1403-1409.

Liu, M., Cai, T., Zhao, F., Zheng, G., Wang, Q., Chen, Y., Huang, C., Luo, W., Chen, J. (2009) Effect of microglia activation on dopaminergic neuronal injury induced by manganese, and its possible mechanism. *Neurotoxicity research*, 16, 42-49.

Loftin, C.D., Tiano, H.F., Langenbach, R. (2002) Phenotypes of the COX-deficient mice indicate physiological and pathophysiological roles for COX-1 and COX-2. Prostaglandins, other lipid mediators, 68-69, 177-185.

Lopez-Rodriguez, A.B., Siopi, E., Finn, D.P., Marchand-Leroux, C., Garcia-Segura, L.M., Jafarian-Tehrani, M., Viveros, M.P. (2015) CB1 and CB2 cannabinoid receptor antagonists prevent minocycline-induced neuroprotection following traumatic brain injury in mice. *Cerebral cortex*, 25, 35-45.

Los, M., Maddika, S., Erb, B., Schulze-Osthoff, K. (2009) Switching Akt: from survival signaling to deadly response. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 31, 492-495.

Lovinger, D.M. (2010) Neurotransmitter roles in synaptic modulation, plasticity and learning in the dorsal striatum. *Neuropharmacology*, 58, 951-961.

Luginger, E., Wenning, G.K., Bosch, S., Poewe, W. (2000) Beneficial effects of amantadine on L-dopa-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 15, 873-878.

Lundblad, M., Usiello, A., Carta, M., Hakansson, K., Fisone, G., Cenci, M.A. (2005) Pharmacological validation of a mouse model of l-DOPA-induced dyskinesia. *Experimental neurology*, 194, 66-75.

Luttrell, L.M., Gesty-Palmer, D. (2010) Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacological reviews*, 62, 305-330.

Luttrell, L.M., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J. (1999) Regulation of tyrosine kinase cascades by G-protein-coupled receptors. *Current opinion in cell biology*, 11, 177-183.

Machado, E.R., Carlos, D., Lourenco, E.V., Souza, G.E., Sorgi, C.A., Silva, E.V., Ueta, M.T., Ramos, S.G., Aronoff, D.M., Faccioli, L.H. (2010) Cyclooxygenase-derived mediators regulate the immunological control of *Strongyloides venezuelensis* infection. *FEMS immunology and medical microbiology*, 59, 18-32.

Maeda, T., Nagata, K., Yoshida, Y. (2008) Exogenous l-DOPA induce no dopamine immuno-reactivity in striatal astroglia and microglia of adult rats with extensive nigro-striatal dopaminergic denervation. *Neuroscience letters*, 433, 255-258.

Magill, P.J., Bolam, J.P., Bevan, M.D. (2001) Dopamine regulates the impact of the cerebral cortex on the subthalamic nucleus-globus pallidus network. *Neuroscience*, 106, 313-330.

Maier, J.A., Hla, T., Maciag, T. (1990) Cyclooxygenase is an immediate-early gene induced by interleukin-1 in human endothelial cells. *The Journal of biological chemistry*, 265, 10805-10808.

Maione, S., De Petrocellis, L., de Novellis, V., Moriello, A.S., Petrosino, S., Palazzo, E., Rossi, F.S., Woodward, D.F., Di Marzo, V. (2007) Analgesic actions of N-arachidonoyl-serotonin, a fatty acid amide hydrolase inhibitor with antagonistic activity at vanilloid TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 150, 766-781.

Maneuf, Y.P., Crossman, A.R., Brochie, J.M. (1997) The cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 reduces D2, but not D1, dopamine receptor-mediated alleviation of akinesia in the reserpine-treated rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 148, 265-270.

Mannoury la Cour, C., Salles, M.J., Pasteau, V., Millan, M.J. (2011) Signaling pathways leading to phosphorylation of Akt and GSK-3 β by activation of cloned human and rat cerebral D(2) and D(3) receptors. *Molecular pharmacology*, 79, 91-105.

Marco, E.M., Garcia-Gutierrez, M.S., Bermudez-Silva, F.J., Moreira, F.A., Guimaraes, F., Manzanares, J., Viveros, M.P. (2011) Endocannabinoid system and psychiatry: in search of a neurobiological basis for detrimental and potential therapeutic effects. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 5, 63.

Marin, I., Kipnis, J. (2013) Learning and memory ... and the immune system. *Learning, memory*, 20, 601-606.

Marinelli, S., Di Marzo, V., Berretta, N., Matias, I., Maccarrone, M., Bernardi, G., Mercuri, N.B. (2003) Presynaptic facilitation of glutamatergic synapses to dopaminergic neurons of the rat substantia nigra by endogenous stimulation of vanilloid receptors. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 23, 3136-3144.

Marsden, C.D., Parkes, J.D. (1977) Success and problems of long-term L-DOPA therapy in Parkinson's disease. *Lancet*, 1, 345-349.

Martin, H.L., Mounsey, R.B., Mustafa, S., Sathe, K., Teismann, P. (2012) Pharmacological manipulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) reveals a role for anti-oxidant protection in a model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 235, 528-538.

Martinez, A.A., Morgese, M.G., Pisanu, A., Macheda, T., Paquette, M.A., Seillier, A., Cassano, T., Carta, A.R., Giuffrida, A. (2015) Activation of PPAR gamma receptors reduces L-DOPA-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. *Neurobiology of disease*, 74, 295-304.

Maura, G., Giardi, A., Raiteri, M. (1988) Release-regulating D-2 dopamine receptors are located on striatal glutamatergic nerve terminals. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 247, 680-684.

Mc Guire, C., Prinz, M., Beyaert, R., van Loo, G. (2013) Nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in multiple sclerosis pathology. *Trends in molecular medicine*, 19, 604-613.

McClung, C.A., Ulery, P.G., Perrotti, L.I., Zachariou, V., Berton, O., Nestler, E.J. (2004) DeltaFosB: a molecular switch for long-term adaptation in the brain. *Brain research. Molecular brain research*, 132, 146-154.

McCormack, A.L., Thiruchelvam, M., Manning-Bog, A.B., Thiffault, C., Langston, J.W., Cory-Slechta, D.A., Di Monte, D.A. (2002) Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. *Neurobiology of disease*, 10, 119-127.

McCoy, M.K., Tansey, M.G. (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of neuroinflammation*, 5, 45.

McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., McGeer, E.G. (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, 38, 1285-1291.

McGeer, P.L., Schwab, C., Parent, A., Doudet, D. (2003) Presence of reactive microglia in monkey substantia nigra years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine administration. *Annals of neurology*, 54, 599-604.

Mechoulam, R., Peters, M., Murillo-Rodriguez, E., Hanus, L.O. (2007) Cannabidiol--recent advances. *Chemistry, biodiversity*, 4, 1678-1692.

Mela, F., Marti, M., Dekundy, A., Danysz, W., Morari, M., Cenci, M.A. (2007) Antagonism of metabotropic glutamate receptor type 5 attenuates L-DOPA-induced dyskinesia and its molecular and neurochemical correlates in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 101, 483-497.

Melis, M., Pillolla, G., Bisogno, T., Minassi, A., Petrosino, S., Perra, S., Muntoni, A.L., Lutz, B., Gessa, G.L., Marsicano, G., Di Marzo, V., Pistis, M. (2006) Protective activation of the endocannabinoid system during ischemia in dopamine neurons. *Neurobiology of disease*, 24, 15-27.

Mena, M.A., Garcia de Yebenes, J. (2008) Glial cells as players in parkinsonism: the "good," the "bad," and the "mysterious" glia. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 14, 544-560.

Meschler, J.P., Howlett, A.C., Madras, B.K. (2001) Cannabinoid receptor agonist and antagonist effects on motor function in normal and 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated non-human primates. *Psychopharmacology*, 156, 79-85.

Mesci, P., Zaidi, S., Lobsiger, C.S., Millecamps, S., Escartin, C., Seilhean, D., Sato, H., Mallat, M., Boillee, S. (2015) System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain : a journal of neurology*, 138, 53-68.

Michel, P.P., Hefti, F. (1990) Toxicity of 6-hydroxydopamine and dopamine for dopaminergic neurons in culture. *Journal of neuroscience research*, 26, 428-435.

Michel, P.P., Ruberg, M., Agid, Y. (1997) Rescue of mesencephalic dopamine neurons by anticancer drug cytosine arabinoside. *Journal of neurochemistry*, 69, 1499-1507.

Miklossy, J., Doudet, D.D., Schwab, C., Yu, S., McGeer, E.G., McGeer, P.L. (2006) Role of ICAM-1 in persisting inflammation in Parkinson disease and MPTP monkeys. *Experimental neurology*, 197, 275-283.

Minghetti, L. (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 63, 901-910.

Mirza, B., Hadberg, H., Thomsen, P., Moos, T. (2000) The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. *Neuroscience*, 95, 425-432.

Mitchell, P.R., Doggett, N.S. (1980) Modulation of striatal [3H]-glutamic acid release by dopaminergic drugs. *Life sciences*, 26, 2073-2081.

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T. (1994) Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. *Neuroscience letters*, 180, 147-150.

Mollace, V., Muscoli, C., Masini, E., Cuzzocrea, S., Salvemini, D. (2005) Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacological reviews*, 57, 217-252.

Moncada, S., Ferreira, S.H., Vane, J.R. (1978) Bioassay of prostaglandins and biologically active substances derived from arachidonic acid. *Advances in prostaglandin and thromboxane research*, 5, 211-236.

Moncada, S., Vane, J.R. (1978) Unstable metabolites of arachidonic acid and their role in haemostasis and thrombosis. *British medical bulletin*, 34, 129-135.

Montgomery, S.L., Bowers, W.J. (2012) Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology: the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 7, 42-59.

Moore, A.H., Bigbee, M.J., Boynton, G.E., Wakeham, C.M., Rosenheim, H.M., Staral, C.J., Morrissey, J.L., Hund, A.K. (2010) Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease: Reconsidering the Role of Neuroinflammation. *Pharmaceuticals*, 3, 1812-1841.

Morari, M., Marti, M., Sbrenna, S., Fuxe, K., Bianchi, C., Beani, L. (1998) Reciprocal dopamine-glutamate modulation of release in the basal ganglia. *Neurochemistry international*, 33, 383-397.

Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S., Ceru, M.P. (2004) Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS. *Neuroscience*, 123, 131-145.

Morgese, M.G., Cassano, T., Cuomo, V., Giuffrida, A. (2007) Anti-dyskinetic effects of cannabinoids in a rat model of Parkinson's disease: role of CB(1) and TRPV1 receptors. *Experimental neurology*, 208, 110-119.

Morin, N., Di Paolo, T. (2014) Pharmacological Treatments Inhibiting L-DOPA-Induced Dyskinesias in MPTP-Lesioned Monkeys: Brain Glutamate Biochemical Correlates. *Frontiers in neurology*, 5, 144.

Morrow, J.D., Awad, J.A., Boss, H.J., Blair, I.A., Roberts, L.J., 2nd (1992) Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 10721-10725.

Mulas, G., Espa, E., Fenu, S., Spiga, S., Cossu, G., Pillai, E., Carboni, E., Simbula, G., Jadzic, D., Angius, F., Spolitu, S., Batetta, B., Lecca, D., Giuffrida, A., Carta, A.R. (2016) Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous L-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 286, 83-92.

Muñoz, A., Garrido-Gil, P., Dominguez-Meijide, A., Labandeira-Garcia, J.L. (2014) Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa-induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta. *Experimental neurology*, 261, 720-732.

Murray, H.J., O'Connor, J.J. (2003) A role for COX-2 and p38 mitogen activated protein kinase in long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuropharmacology*, 44, 374-380.

Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., Togari, A. (2000) Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*, 277-290.

Nambu, A., Tokuno, H., Hamada, I., Kita, H., Imanishi, M., Akazawa, T., Ikeuchi, Y., Hasegawa, N. (2000) Excitatory cortical inputs to pallidal neurons via the subthalamic nucleus in the monkey. *Journal of neurophysiology*, 84, 289-300.

Nambu, A., Tokuno, H., Takada, M. (2002) Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. *Neuroscience research*, 43, 111-117.

Ndengele, M.M., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Mazzon, E., Di Paola, R., Matuschak, G.M., Salvemini, D. (2008) Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22, 3154-3164.

Necela, B.M., Cidlowski, J.A. (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor action in noninflammatory and inflammatory cells. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 1, 239-246.

Neeb, L., Reuter, U. (2007) Nitric oxide in migraine. *CNS, neurological disorders drug targets*, 6, 258-264.

Needleman, P. (1994) In search of a better NSAID. *Proceedings of the 9th International Conference on Prostaglandins and Related Compounds. Florence, Italy*, 6-10.

Newsholme, P., Haber, E.P., Hirabara, S.M., Rebelato, E.L., Procopio, J., Morgan, D., Oliveira-Emilio, H.C., Carpinelli, A.R., Curi, R. (2007) Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *The Journal of physiology*, 583, 9-24.

Ni, Z., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D., Benabid, A.L., Benazzouz, A. (2000) Changes in the firing pattern of globus pallidus neurons after the degeneration of nigrostriatal pathway are mediated by the subthalamic nucleus in the rat. *The European journal of neuroscience*, 12, 4338-4344.

Ni, Z.G., Bouali-Benazzouz, R., Gao, D.M., Benabid, A.L., Benazzouz, A. (2001) Time-course of changes in firing rates and firing patterns of subthalamic nucleus neuronal activity after 6-OHDA-induced dopamine depletion in rats. *Brain research*, 899, 142-147.

Nicola, S.M. (2007) The nucleus accumbens as part of a basal ganglia action selection circuit. *Psychopharmacology*, 191, 521-550.

Nogawa, S., Zhang, F., Ross, M.E., Iadecola, C. (1997) Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17, 2746-2755.

Noh, J.S., Kim, E.Y., Kang, J.S., Kim, H.R., Oh, Y.J., Gwag, B.J. (1999) Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons. *Experimental neurology*, 159, 217-224.

Nutt, J.G. (1990) L-DOPA-induced dyskinesia: review, observations, and speculations. *Neurology*, 40, 340-345.

Nutt, J.G., Holford, N.H. (1996) The response to L-DOPA in Parkinson's disease: imposing pharmacological law and order. *Annals of neurology*, 39, 561-573.

Nutt, J.G., Woodward, W.R., Hammerstad, J.P., Carter, J.H., Anderson, J.L. (1984) The "on-off" phenomenon in Parkinson's disease. Relation to L-DOPA absorption and transport. *The New England journal of medicine*, 310, 483-488.

O'Banion, M.K. (1999) Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Critical reviews in neurobiology*, 13, 45-82.

Offen, D., Hochman, A., Gorodin, S., Ziv, I., Shirvan, A., Barzilai, A., Melamed, E. (1999) Oxidative stress and neuroprotection in Parkinson's disease: implications from studies on dopamine-induced apoptosis. *Advances in neurology*, 80, 265-269.

Offen, D., Ziv, I., Sternin, H., Melamed, E., Hochman, A. (1996) Prevention of dopamine-induced cell death by thiol antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, 141, 32-39.

Oh, J.D., Russell, D.S., Vaughan, C.L., Chase, T.N. (1998) Enhanced tyrosine phosphorylation of striatal NMDA receptor subunits: effect of dopaminergic denervation and L-DOPA administration. *Brain research*, 813, 150-159.

Ohlin, K.E., Francardo, V., Lindgren, H.S., Sullivan, S.E., O'Sullivan, S.S., Luksik, A.S., Vassoler, F.M., Lees, A.J., Konradi, C., Cenci, M.A. (2011) Vascular endothelial growth factor is upregulated by L-dopa in the parkinsonian brain: implications for the development of dyskinesia. *Brain : a journal of neurology*, 134, 2339-2357.

Ohlin, K.E., Sebastianutto, I., Adkins, C.E., Lundblad, C., Lockman, P.R., Cenci, M.A. (2012) Impact of L-DOPA treatment on regional cerebral blood flow and metabolism in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *NeuroImage*, 61, 228-239.

Ohta, K., Kuno, S., Inoue, S., Ikeda, E., Fujinami, A., Ohta, M. (2010) The effect of dopamine agonists: the expression of GDNF, NGF, and BDNF in cultured mouse astrocytes. *Journal of the neurological sciences*, 291, 12-16.

Okoh, V.O., Felty, Q., Parkash, J., Poppiti, R., Roy, D. (2013) Reactive oxygen species via redox signaling to PI3K/AKT pathway contribute to the malignant growth of 4-hydroxy estradiol-transformed mammary epithelial cells. *PloS one*, 8, e54206.

Olanow, C.W., Lees, A., Obeso, J. (2008) L-DOPA therapy for Parkinson's disease: challenges and future prospects. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 23 Suppl 3, S495-496.

Olmos, G., Llado, J. (2014) Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators of inflammation*, 2014, 861231.

Ossola, B., Schendzielorz, N., Chen, S.H., Bird, G.S., Tuominen, R.K., Mannisto, P.T., Hong, J.S. (2011) Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia [corrected]. *Neuropharmacology*, 61, 574-582.

O'Sullivan, S.E. (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *British journal of pharmacology*, 152, 576-582.

Overton, H.A., Babbs, A.J., Doel, S.M., Fyfe, M.C., Gardner, L.S., Griffin, G., Jackson, H.C., Procter, M.J., Rasamison, C.M., Tang-Christensen, M., Widdowson, P.S., Williams, G.M., Reynet, C. (2006) Deorphanization of a G protein-coupled receptor for oleylethanolamide and its use in the discovery of small-molecule hypophagic agents. *Cell metabolism*, 3, 167-175.

Packard, M.G., Knowlton, B.J. (2002) Learning and memory functions of the Basal Ganglia. *Annual review of neuroscience*, 25, 563-593.

Padovan-Neto, F.E., Cavalcanti-Kiwiatkoviski, R., Carolino, R.O., Anselmo-Franci, J., Del Bel, E. (2015) Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. *Neuropharmacology*, 89, 87-99.

Padovan-Neto, F.E., Echeverry, M.B., Chiavegatto, S., Del-Bel, E. (2011) Nitric Oxide Synthase Inhibitor Improves De Novo and Long-Term L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats. *Frontiers in systems neuroscience*, 5, 40.

Padovan-Neto, F.E., Echeverry, M.B., Tumas, V., Del-Bel, E.A. (2009) Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 159, 927-935.

Padovan-Neto, F.E., Ferreira, N.R., de Oliveira-Tavares, D., de Aguiar, D., da Silva, C.A., Raisman-Vozari, R., Del Bel, E. (2013) Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. *Neuroscience letters*, 541, 126-131.

Panikashvili, D., Mechoulam, R., Beni, S.M., Alexandrovich, A., Shohami, E. (2005) CB1 cannabinoid receptors are involved in neuroprotection via NF-kappa B inhibition. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 25, 477-484.

Papa, S.M., Chase, T.N. (1996) L-DOPA-induced dyskinesias improved by a glutamate antagonist in Parkinsonian monkeys. *Annals of neurology*, 39, 574-578.

Parent, A., Hazrati, L.N. (1995) Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. *Brain research. Brain research reviews*, 20, 128-154.

Parkinson Study Group. (1996) Impact of deprenyl and tocopherol treatment on Parkinson's disease in DATATOP patients requiring L-DOPA. *Annals of neurology*, 39, 37-45.

Parkkinen, L., O'Sullivan, S.S., Kuoppamaki, M., Collins, C., Kallis, C., Holton, J.L., Williams, D.R., Revesz, T., Lees, A.J. (2011) Does L-DOPA accelerate the pathologic process in Parkinson disease brain? *Neurology*, 77, 1420-1426.

Pavon, N., Martin, A.B., Mendialdua, A., Moratalla, R. (2006) ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biological psychiatry*, 59, 64-74.

Paxinos, G., Franklin, K.B.J. (2001) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. San Diego, CA: Elsevier Science.

Payandemehr, B., Ebrahimi, A., Gholizadeh, R., Rahimian, R., Varastehmoradi, B., Gooshe, M., Aghaei, H.N., Mousavizadeh, K., Dehpour, A.R. (2015) Involvement of PPAR receptors in the anticonvulsant effects of a cannabinoid agonist, WIN 55,212-2. *Progress in neuro-psychopharmacology, biological psychiatry*, 57, 140-145.

Pedrazzi, J.F., Issy, A.C., Gomes, F.V., Guimaraes, F.S., Del-Bel, E.A. (2015) Cannabidiol effects in the prepulse inhibition disruption induced by amphetamine. *Psychopharmacology*, 232, 3057-3065.

Pertwee, R.G., Ross, R.A. (2002) Cannabinoid receptors and their ligands. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids, 66, 101-121.

Piallat, B., Benazzouz, A., Benabid, A.L. (1996) Subthalamic nucleus lesion in rats prevents dopaminergic nigral neuron degeneration after striatal 6-OHDA injection: behavioural and immunohistochemical studies. *The European journal of neuroscience*, 8, 1408-1414.

Piani, D., Spranger, M., Frei, K., Schaffner, A., Fontana, A. (1992) Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines. *European journal of immunology*, 22, 2429-2436.

Piper, P., Vane, J. (1971) The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 180, 363-385.

Pisani, V., Moschella, V., Bari, M., Fezza, F., Galati, S., Bernardi, G., Stanzione, P., Pisani, A., Maccarrone, M. (2010) Dynamic changes of anandamide in the cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25, 920-924.

Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wardas, J., Simbula, G., Spiga, S., Carta, A.R. (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR-gamma agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiology of disease*, 71, 280-291.

Popat, R.A., Van Den Eeden, S.K., Tanner, C.M., McGuire, V., Bernstein, A.L., Bloch, D.A., Leimpeter, A., Nelson, L.M. (2005) Effect of reproductive factors and postmenopausal hormone use on the risk of Parkinson disease. *Neurology*, 65, 383-390.

Porat, S., Simantov, R. (1999) Bcl-2 and p53: role in dopamine-induced apoptosis and differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 893, 372-375.

Premkumar, A., Simantov, R. (2002) Mitochondrial voltage-dependent anion channel is involved in dopamine-induced apoptosis. *Journal of neurochemistry*, 82, 345-352.

Prescott, I.A., Dostrovsky, J.O., Moro, E., Hodaie, M., Lozano, A.M., Hutchison, W.D. (2009) L-DOPA enhances synaptic plasticity in the substantia nigra pars reticulata of Parkinson's disease patients. *Brain : a journal of neurology*, 132, 309-318.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W.C., LaMantia, A.S., White, L.E. (2012) *Neurociências*. 5ª Edição. Editora Artmed – Porto Alegre.

Ragonese, P., D'Amelio, M., Salemi, G., Aridon, P., Gammino, M., Epifanio, A., Morgante, L., Savettieri, G. (2004) Risk of Parkinson disease in women: effect of reproductive characteristics. *Neurology*, 62, 2010-2014.

Rai, S.N., Birla, H., Zahra, W., Singh, S.S., Singh, S.P. (2017) Immunomodulation of Parkinson's disease using *Mucuna pruriens* (Mp). *Journal of chemical neuroanatomy*, 85, 27-35.

Rajan, S. (2012) Lewy bodies (alpha synuclein inclusions). [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lewy_bodies_\(alpha_synuclein_inclusions\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lewy_bodies_(alpha_synuclein_inclusions).jpg)

Ramirez-Garcia, G., Palafox-Sanchez, V. & Limon, I.D. (2015) Nitrosative and cognitive effects of chronic L-DOPA administration in rats with intra-nigral 6-OHDA lesion. *Neuroscience*, 290, 492-508.

Rappold, P.M., Tieu, K. (2010) Astrocytes and therapeutics for Parkinson's disease. *Neurotherapeutics: the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 7, 413-423.

Rascol, O. (2000) Medical treatment of L-DOPA-induced dyskinesias. *Annals of neurology*, 47, S179-188.

Rau, T.F., Kothiwala, A., Zhang, L., Ulatowski, S., Jacobson, S., Brooks, D.M., Cardozo-Pelaez, F., Chopp, M., Poulsen, D.J. (2011) Low dose methamphetamine mediates neuroprotection through a PI3K-AKT pathway. *Neuropharmacology*, 61, 677-686.

Rau, T.F., Kothiwala, A., Zhang, L., Ulatowski, S., Jacobson, S., Brooks, D.M., Cardozo-Pelaez, F., Chopp, M., Poulsen, D.J. (2011) Low dose methamphetamine mediates neuroprotection through a PI3K-AKT pathway. *Neuropharmacology*, 61, 677-686.

Rentzos, M., Nikolaou, C., Andreadou, E., Paraskevas, G.P., Rombos, A., Zoga, M., Tsoutsou, A., Boufidou, F., Kapaki, E., Vassilopoulos, D. (2007) Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease. *Acta neurologica Scandinavica*, 116, 374-379.

Ricote, M., Li, A.C., Willson, T.M., Kelly, C.J., Glass, C.K. (1998) The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 391, 79-82.

Rivlin-Etzion, M., Elias, S., Heimer, G., Bergman, H. (2010) Computational physiology of the basal ganglia in Parkinson's disease. *Progress in brain research*, 183, 259-273.

Robelet, S., Melon, C., Guillet, B., Salin, P., Kerkerian-Le Goff, L. (2004) Chronic L-DOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal

ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, 20, 1255-1266.

Robson, P. (2011) Abuse potential and psychoactive effects of delta-9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol oromucosal spray (Sativex), a new cannabinoid medicine. *Expert opinion on drug safety*, 10, 675-685.

Rockwell, C.E., Snider, N.T., Thompson, J.T., Vanden Heuvel, J.P., Kaminski, N.E. (2006) Interleukin-2 suppression by 2-arachidonyl glycerol is mediated through peroxisome proliferator-activated receptor gamma independently of cannabinoid receptors 1 and 2. *Molecular pharmacology*, 70, 101-111.

Rodrigues, J.P., Walters, S.E., Stell, R., Mastaglia, F.L., Thickbroom, G.W. (2008) Spike-timing-related plasticity is preserved in Parkinson's disease and is enhanced by dopamine: evidence from transcranial magnetic stimulation. *Neuroscience letters*, 448, 29-32.

Rodriguez de Fonseca, F., Del Arco, I., Bermudez-Silva, F.J., Bilbao, A., Cippitelli, A., Navarro, M. (2005) The endocannabinoid system: physiology and pharmacology. *Alcohol and alcoholism*, 40, 2-14.

Rodriguez, M.C., Obeso, J.A., Olanow, C.W. (1998) Subthalamic nucleus-mediated excitotoxicity in Parkinson's disease: a target for neuroprotection. *Annals of neurology*, 44, S175-188.

Rojanathammanee, L., Murphy, E.J., Combs, C.K. (2011) Expression of mutant alpha-synuclein modulates microglial phenotype in vitro. *Journal of neuroinflammation*, 8, 44.

Ross, R.A. (2003) Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British journal of pharmacology*, 140, 790-801.

Rossi, S., Motta, C., Musella, A., Centonze, D. (2015) The interplay between inflammatory cytokines and the endocannabinoid system in the regulation of synaptic transmission. *Neuropharmacology*, 96, 105-112.

Rousseau, E., Michel, P.P., Hirsch, E.C. (2013) The iron-binding protein lactoferrin protects vulnerable dopamine neurons from degeneration by preserving mitochondrial calcium homeostasis. *Molecular pharmacology*, 84, 888-898.

Rowlands, G.F., Roberts, P.J. (1980) Activation of dopamine receptors inhibits calcium-dependent glutamate release from cortico-striatal terminals in vitro. *European journal of pharmacology*, 62, 241-242.

Ruiz-DeDiego, I., Naranjo, J.R., Herve, D., Moratalla, R. (2015) Dopaminergic regulation of olfactory type G-protein alpha subunit expression in the striatum. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 30, 1039-1049.

Rylander, D., Recchia, A., Mela, F., Dekundy, A., Danysz, W., Cenci, M.A. (2009) Pharmacological modulation of glutamate transmission in a rat model of L-DOPA-induced dyskinesia: effects on motor behavior and striatal nuclear signaling. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 330, 227-235.

Sage, J.I., Mark, M.H., McHale, D.M., Sonsalla, P.K., Vitagliano, D. (1991) Benefits of monitoring plasma L-DOPA in Parkinson's disease patients with drug-induced chorea. *Annals of neurology*, 29, 623-628.

Sagredo, O., Garcia-Arencibia, M., de Lago, E., Finetti, S., Decio, A., Fernandez-Ruiz, J. (2007) Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Molecular neurobiology*, 36, 82-91.

Saka, E., Graybiel, A.M. (2003) Pathophysiology of Tourette's syndrome: striatal pathways revisited. *Brain, development*, 25 Suppl 1, S15-19.

Samii, A., Etminan, M., Wiens, M.O., Jafari, S. (2009) NSAID use and the risk of Parkinson's disease: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Drugs & aging*, 26, 769-779.

Samuelsson, B., Borgeat, P., Hammarstrom, S., Murphy, R.C. (1980) Leukotrienes: a new group of biologically active compounds. *Advances in prostaglandin and thromboxane research*, 6, 1-18.

Samuelsson, B., Granstrom, E., Green, K., Hamberg, M., Hammarstrom, S. (1975) Prostaglandins. *Annual review of biochemistry*, 44, 669-695.

Sanchez-Pernaute, R., Ferree, A., Cooper, O., Yu, M., Brownell, A.L., Isacson, O. (2004) Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. *Journal of neuroinflammation*, 1, 6.

Santa-Cecilia, F.V., Socias, B., Ouidja, M.O., Sepulveda-Diaz, J.E., Acuna, L., Silva, R.L., Michel, P.P., Del-Bel, E., Cunha, T.M., Raisman-Vozari, R. (2016) Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF-kB Signaling Pathways. *Neurotoxicity research*, 29, 447-459.

Santello, M., Bezzi, P., Volterra, A. (2011) TNF α controls glutamatergic gliotransmission in the hippocampal dentate gyrus. *Neuron*, 69, 988-1001.

Santello, M., Volterra, A. (2012) TNF α in synaptic function: switching gears. *Trends in neurosciences*, 35, 638-647.

Santini, E., Sgambato-Faure, V., Li, Q., Savasta, M., Dovero, S., Fisone, G., Bezard, E. (2010) Distinct changes in cAMP and extracellular signal-regulated protein kinase signalling in L-DOPA-induced dyskinesia. *PloS one*, 5, e12322.

Santini, E., Valjent, E., Usiello, A., Carta, M., Borgkvist, A., Girault, J.A., Herve, D., Greengard, P., Fisone, G. (2007) Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27, 6995-7005.

Sanudo-Pena, M.C., Patrick, S.L., Khen, S., Patrick, R.L., Tsou, K., Walker, J.M. (1998) Cannabinoid effects in basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 248, 171-174.

Savica, R., Parisi, J.E., Wold, L.E., Josephs, K.A., Ahlskog, J.E. (2012) High school football and risk of neurodegeneration: a community-based study. *Mayo Clinic proceedings*, 87, 335-340.

Schapira, A.H. (2002) Neuroprotection and dopamine agonists. *Neurology*, 58, S9-18.

Schiess, M. (2003) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs protect against Parkinson neurodegeneration: can an NSAID a day keep Parkinson disease away? *Archives of neurology*, 60, 1043-1044.

Schmitz, K.J., Wohlschlaeger, J., Lang, H., Sotiropoulos, G.C., Malago, M., Steveling, K., Reis, H., Cicinnati, V.R., Schmid, K.W., Baba, H.A. (2008) Activation of the ERK and AKT signalling pathway predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and ERK activation in cancer tissue is associated with hepatitis C virus infection. *Journal of hepatology*, 48, 83-90.

Schuster, S., Doudnikoff, E., Rylander, D., Berthet, A., Aubert, I., Ittrich, C., Bloch, B., Cenci, M.A., Surmeier, D.J., Hengerer, B., Bezard, E. (2009) Antagonizing L-type Ca²⁺ channel reduces development of abnormal involuntary movement in the rat model of L-3,4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Biological psychiatry*, 65, 518-526.

Sepulveda-Diaz, J.E., Ouidja, M.O., Socias, S.B., Hamadat, S., Guerreiro, S., Raisman-Vozari, R., Michel, P.P. (2016) A simplified approach for efficient isolation of functional microglial cells: Application for modeling neuroinflammatory responses in vitro. *Glia*, 64, 1912-1924.

Shaw, K.N., Commins, S., O'Mara, S.M. (2003) Deficits in spatial learning and synaptic plasticity induced by the rapid and competitive broad-spectrum cyclooxygenase inhibitor ibuprofen are reversed by increasing endogenous brain-derived neurotrophic factor. *The European journal of neuroscience*, 17, 2438-2446.

Shie, F.S., Montine, K.S., Breyer, R.M., Montine, T.J. (2005) Microglial EP2 is critical to neurotoxicity from activated cerebral innate immunity. *Glia*, 52, 70-77.

Siegel, G.J., Agranoff, B.W., Albers, R.W., Molinoff, P.B. (2007) *Basic Neurochemistry*. Raven Press. New York. USA.

Sieradzan, K.A., Fox, S.H., Hill, M., Dick, J.P., Crossman, A.R., Brotchie, J.M. (2001) Cannabinoids reduce L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a pilot study. *Neurology*, 57, 2108-2111.

Silverdale, M.A., Kobylecki, C., Hallett, P.J., Li, Q., Dunah, A.W., Ravenscroft, P., Bezard, E., Brotchie, J.M. (2010) Synaptic recruitment of AMPA glutamate receptor subunits in L-DOPA-induced dyskinesia in the MPTP-lesioned nonhuman primate. *Synapse*, 64, 177-180.

Slanina, K.A., Roberto, M., Schweitzer, P. (2005) Endocannabinoids restrict hippocampal long-term potentiation via CB1. *Neuropharmacology*, 49, 660-668.

Slanina, K.A., Schweitzer, P. (2005) Inhibition of cyclooxygenase-2 elicits a CB1-mediated decrease of excitatory transmission in rat CA1 hippocampus. *Neuropharmacology*, 49, 653-659.

Smith, S.R., Terminelli, C., Denhardt, G. (2000) Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 293, 136-150.

Sofroniew, M.V., Vinters, H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, 119, 7-35.

Solis, O., Espadas, I., Del-Bel, E.A., Moratalla, R. (2015) Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3(-/-) aphakia mice. *Neurobiology of disease*, 73, 49-59.

Spillantini, M.G., Schmidt, M.L., Lee, V.M., Trojanowski, J.Q., Jakes, R., Goedert, M. (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, 388, 839-840.

Spinnewyn, B., Mautino, G., Marin, J.G., Rocher, M.N., Grandoulier, A.S., Ferrandis, E., Auguet, M., Chabrier, P.E. (2011) BN82451 attenuates L-dopa-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. *Neuropharmacology*, 60, 692-700.

Steigerwald, F., Potter, M., Herzog, J., Pinsker, M., Kopper, F., Mehdorn, H., Deuschl, G., Volkmann, J. (2008) Neuronal activity of the human subthalamic nucleus in the parkinsonian and nonparkinsonian state. *Journal of neurophysiology*, 100, 2515-2524.

St-Hilaire, M., Landry, E., Levesque, D., Rouillard, C. (2005) Denervation and repeated L-DOPA induce complex regulatory changes in neurochemical phenotypes of striatal neurons: implication of a dopamine D1-dependent mechanism. *Neurobiology of disease*, 20, 450-460.

Stott, S.R., Barker, R.A. (2014) Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. *The European journal of neuroscience*, 39, 1042-1056.

Stypula, G., Kunert-Radek, J., Stepień, H., Zylinska, K., Pawlikowski, M. (1996) Evaluation of interleukins, ACTH, cortisol and prolactin concentrations in the blood of patients with parkinson's disease. *Neuroimmunomodulation*, 3, 131-134.

Surace, M.J., Block, M.L. (2012) Targeting microglia-mediated neurotoxicity: the potential of NOX2 inhibitors. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 69, 2409-2427.

Surmeier, D.J., Ding, J., Day, M., Wang, Z., Shen, W. (2007) D1 and D2 dopamine-receptor modulation of striatal glutamatergic signaling in striatal medium spiny neurons. *Trends in neurosciences*, 30, 228-235.

Svenningsson, P., Tzavara, E.T., Carruthers, R., Rachleff, I., Wattler, S., Nehls, M., McKinzie, D.L., Fienberg, A.A., Nomikos, G.G., Greengard, P. (2003) Diverse psychotomimetics act through a common signaling pathway. *Science*, 302, 1412-1415.

Swift, J.L., Godin, A.G., Dore, K., Frelund, L., Bouchard, N., Nimmo, C., Sergeev, M., De Koninck, Y., Wiseman, P.W., Beaulieu, J.M. (2011) Quantification of receptor tyrosine kinase transactivation through direct dimerization and surface density measurements in single cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 7016-7021.

Szallasi, A., Di Marzo, V. (2000) New perspectives on enigmatic vanilloid receptors. *Trends in neurosciences*, 23, 491-497.

Takahashi, H., Wakabayashi, K. (2001) The cellular pathology of Parkinson's disease. *Neuropathology : official journal of the Japanese Society of Neuropathology*, 21, 315-322.

Takaki, J., Fujimori, K., Miura, M., Suzuki, T., Sekino, Y., Sato, K. (2012) L-glutamate released from activated microglia downregulates astrocytic L-glutamate transporter expression in neuroinflammation: the 'collusion' hypothesis for increased extracellular L-glutamate concentration in neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, 9, 275.

Tanabe, T., Tohnai, N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins, other lipid mediators*, 68-69, 95-114.

Tanner, C.M. (2010) Advances in environmental epidemiology. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 25 Suppl 1, S58-62.

Tanner, C.M., Kamel, F., Ross, G.W., Hoppin, J.A., Goldman, S.M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G.S., Kasten, M., Chade, A.R., Comyns, K., Richards, M.B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H.H., Cambi, F., Umbach, D.M., Blair, A., Sandler, D.P., Langston, J.W. (2011) Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. *Environmental health perspectives*, 119, 866-872.

Tanner, C.M., Ross, G.W., Jewell, S.A., Hauser, R.A., Jankovic, J., Factor, S.A., Bressman, S., Deligtisch, A., Marras, C., Lyons, K.E., Bhudhikanok, G.S., Roucoux, D.F., Meng, C., Abbott, R.D., Langston, J.W. (2009) Occupation and risk of parkinsonism: a multicenter case-control study. *Archives of neurology*, 66, 1106-1113.

Tansey, M.G., McCoy, M.K., Frank-Cannon, T.C. (2007) Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology*, 208, 1-25.

Tarazi, F.I., Baldessarini, R.J. (1999) Regional localization of dopamine and ionotropic glutamate receptor subtypes in striatolimbic brain regions. *Journal of neuroscience research*, 55, 401-410.

Tassoni, D., Kaur, G., Weisinger, R.S., Sinclair, A.J. (2008) The role of eicosanoids in the brain. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 17 Suppl 1, 220-228.

Tavares, D. O. (2013) Expressão da proteína cicloxigenase-2 no estriado de camundongos parkinsonianos tratados com L-DOPA. *Dissertação de Mestrado*.

Taylor, J.L., Bishop, C., Walker, P.D. (2005) Dopamine D1 and D2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 81, 887-893.

Teema, A.M., Zaitone, S.A., Moustafa, Y.M. (2016) Ibuprofen or piroxicam protects nigral neurons and delays the development of l-dopa induced dyskinesia in rats with experimental Parkinsonism: Influence on angiogenesis. *Neuropharmacology*, 107, 432-450.

Teismann, P., Ferger, B. (2001) Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse*, 39, 167-174.

Teismann, P., Schulz, J.B. (2004) Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. *Cell and tissue research*, 318, 149-161.

Teismann, P. (2012) COX-2 in the neurodegenerative process of Parkinson's disease. *BioFactors*, 38, 395-397.

Teismann, P., Ferger, B. (2001) Inhibition of the cyclooxygenase isoenzymes COX-1 and COX-2 provide neuroprotection in the MPTP-mouse model of Parkinson's disease. *Synapse*, 39, 167-174.

Teismann, P., Tieu, K., Choi, D.K., Wu, D.C., Naini, A., Hunot, S., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. (2003) Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 5473-5478.

Terasaka, H., Tamura, A., Takayama, F., Kashimata, M., Ohtomo, K., Machino, M., Fujisawa, S., Toguchi, M., Kanda, Y., Kunii, S., Kusama, K., Ishino, A., Watanabe, S., Satoh, K., Takano, H., Takahama, M., Sakagami, H. (2000) Induction of apoptosis by dopamine in human oral tumor cell lines. *Anticancer research*, 20, 243-250.

Timmons, S., Coakley, M.F., Moloney, A.M., C, O.N. (2009) Akt signal transduction dysfunction in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 467, 30-35.

Troadec, J.D., Marien, M., Darios, F., Hartmann, A., Ruberg, M., Colpaert, F., Michel, P.P. (2001) Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress. *Journal of neurochemistry*, 79, 200-210.

Turski, L., Bressler, K., Rettig, K.J., Loschmann, P.A., Wachtel, H. (1991) Protection of substantia nigra from MPP⁺ neurotoxicity by N-methyl-D-aspartate antagonists. *Nature*, 349, 414-418.

Tzeng, S.F., Hsiao, H.Y., Mak, O.T. (2005) Prostaglandins and cyclooxygenases in glial cells during brain inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy*, 4, 335-340.

Uribe Roca, M.C., Micheli, F., Viotti, R. (2005) Cannabis sativa and dystonia secondary to Wilson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 20, 113-115.

Valdeolivas, S., Pazos, M.R., Bisogno, T., Piscitelli, F., Iannotti, F.A., Allara, M., Sagredo, O., Di Marzo, V., Fernandez-Ruiz, J. (2013) The inhibition of 2-arachidonoyl-glycerol (2-AG) biosynthesis, rather than enhancing striatal damage, protects striatal neurons from malonate-induced death: a potential role of cyclooxygenase-2-dependent metabolism of 2-AG. *Cell death, disease*, 4, e862.

Vane, J.R., Bakhle, Y.S., Botting, R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 38, 97-120.

Venderova, K., Ruzicka, E., Vorisek, V., Visnovsky, P. (2004) Survey on cannabis use in Parkinson's disease: subjective improvement of motor symptoms. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, 19, 1102-1106.

Verhagen Metman, L., Del Dotto, P., van den Munckhof, P., Fang, J., Mouradian, M.M., Chase, T.N. (1998) Amantadine as treatment for dyskinesias and motor fluctuations in Parkinson's disease. *Neurology*, 50, 1323-1326.

Vernon, A.C., Zbarsky, V., Datla, K.P., Croucher, M.J., Dexter, D.T. (2007a) Subtype selective antagonism of substantia nigra pars compacta Group I metabotropic glutamate receptors protects the nigrostriatal system against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo. *Journal of neurochemistry*, 103, 1075-1091.

Vernon, A.C., Zbarsky, V., Datla, K.P., Dexter, D.T., Croucher, M.J. (2007b) Selective activation of group III metabotropic glutamate receptors by L-(+)-2-amino-4-phosphonobutyric acid protects the nigrostriatal system against 6-hydroxydopamine toxicity in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 320, 397-409.

Vezzani, A., Maroso, M., Balosso, S., Sanchez, M.A., Bartfai, T. (2011) IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain, behavior, and immunity*, 25, 1281-1289.

Vezzani, A., Viviani, B. (2015) Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, 96, 70-82.

Walkinshaw, G., Waters, C.M. (1995) Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *The Journal of clinical investigation*, 95, 2458-2464.

Wallace, B.A., Ashkan, K., Heise, C.E., Foote, K.D., Torres, N., Mitrofanis, J., Benabid, A.L. (2007) Survival of midbrain dopaminergic cells after lesion or deep brain stimulation of the subthalamic nucleus in MPTP-treated monkeys. *Brain: a journal of neurology*, 130, 2129-2145.

Walsh, S., Mnich, K., Mackie, K., Gorman, A.M., Finn, D.P., Dowd, E. (2010) Loss of cannabinoid CB1 receptor expression in the 6-hydroxydopamine-induced nigrostriatal terminal lesion model of Parkinson's disease in the rat. *Brain research bulletin*, 81, 543-548.

- Wang, C., Buck, D.C., Yang, R., Macey, T.A., Neve, K.A. (2005) Dopamine D2 receptor stimulation of mitogen-activated protein kinases mediated by cell type-dependent transactivation of receptor tyrosine kinases. *Journal of neurochemistry*, 93, 899-909.
- Wang, H., Hitron, I.M., Iadecola, C., Pickel, V.M. (2005) Synaptic and vascular associations of neurons containing cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase in rat somatosensory cortex. *Cerebral cortex*, 15, 1250-1260.
- Wang, Y., Zhang, Q.J., Wang, H.S., Wang, T., Liu, J. (2014) Genome-wide microarray analysis identifies a potential role for striatal retrograde endocannabinoid signaling in the pathogenesis of experimental L-DOPA-induced dyskinesia. *Synapse*, 68, 332-343.
- Watson, M.B., Richter, F., Lee, S.K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R.B., Chesselet, M.F. (2012) Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Experimental neurology*, 237, 318-334.
- Westin, J.E., Lindgren, H.S., Gardi, J., Nyengaard, J.R., Brundin, P., Mohapel, P., Cenci, M.A. (2006) Endothelial proliferation and increased blood-brain barrier permeability in the basal ganglia in a rat model of 3,4-dihydroxyphenyl-L-alanine-induced dyskinesia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26, 9448-9461.
- 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 L-DOPA-induced dyskinesia and the role of dopamine D1 receptors. *Biological psychiatry*, 62, 800-810.
- Wichmann, T., Bergman, H., DeLong, M.R. (1994) The primate subthalamic nucleus. III. Changes in motor behavior and neuronal activity in the internal pallidum induced by subthalamic inactivation in the MPTP model of parkinsonism. *Journal of neurophysiology*, 72, 521-530.
- Wickremaratchi, M.M., Ben-Shlomo, Y., Morris, H.R. (2009) The effect of onset age on the clinical features of Parkinson's disease. *European journal of neurology*, 16, 450-456.
- Wiecki, T.V., Frank, M.J. (2010) Neurocomputational models of motor and cognitive deficits in Parkinson's disease. *Progress in brain research*, 183, 275-297.
- Wilkaniec, A., Strosznajder, J.B., Adamczyk, A. (2013) Toxicity of extracellular secreted alpha-synuclein: Its role in nitrosative stress and neurodegeneration. *Neurochemistry international*, 62, 776-783.
- Willoughby, D.A., Moore, A.R., Colville-Nash, P.R. (2000) COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*, 355, 646-648.
- Wyss-Coray, T., Mucke, L. (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron*, 35, 419-432.
- Xia, Q., Hu, Q., Wang, H., Yang, H., Gao, F., Ren, H., Chen, D., Fu, C., Zheng, L., Zhen, X., Ying, Z., Wang, G. (2015) Induction of COX-2-PGE2 synthesis by activation of the MAPK/ERK pathway contributes to neuronal death triggered by TDP-43-depleted microglia. *Cell death, disease*, 6, e1702.
- Xie, W.L., Chipman, J.G., Robertson, D.L., Erikson, R.L., Simmons, D.L. (1991) Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 2692-2696.

- Yamagata, K., Andreasson, K.I., Kaufmann, W.E., Barnes, C.A., Worley, P.F. (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 11, 371-386.
- Yang, H., Chen, C. (2008) Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. *Current pharmaceutical design*, 14, 1443-1451.
- Yin, H.H., Knowlton, B.J. (2006) The role of the basal ganglia in habit formation. *Nature reviews. Neuroscience*, 7, 464-476.
- Zeng, B.Y., Dass, B., Owen, A., Rose, S., Cannizzaro, C., Tel, B.C., Jenner, P. (1999) Chronic L-DOPA treatment increases striatal cannabinoid CB1 receptor mRNA expression in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *Neuroscience letters*, 276, 71-74.
- Zhao, L., Brinton, R.D. (2004) Suppression of proinflammatory cytokines interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha in astrocytes by a V1 vasopressin receptor agonist: a cAMP response element-binding protein-dependent mechanism. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24, 2226-2235.
- Zidar, N., Odar, K., Glavac, D., Jerse, M., Zupanc, T., Stajer, D. (2009) Cyclooxygenase in normal human tissues--is COX-1 really a constitutive isoform, and COX-2 an inducible isoform? *Journal of cellular and molecular medicine*, 13, 3753-3763.
- Zigmond, M.J., Bloom, F.E., Landis, S.C., Roberts, J.L., Squire, L.R. (1999) *Fundamental Neuroscience*. Acad. Press. San Diego, California, USA.
- Ziv, I., Melamed, E., Nardi, N., Luria, D., Achiron, A., Offen, D., Barzilai, A. (1994) Dopamine induces apoptosis-like cell death in cultured chick sympathetic neurons--a possible novel pathogenetic mechanism in Parkinson's disease. *Neuroscience letters*, 170, 136-140.

APÊNDICE - ARTIGOS PUBLICADOS RELACIONADOS À TESE

Contents lists available at ScienceDirect

Neurobiology of Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ynbdi

Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: Possible mechanism of action

Maurício dos-Santos-Pereira^{a,b,c}, Célia Aparecida da-Silva^{a,b},
Francisco Silveira Guimarães^{b,d}, Elaine Del-Bel^{a,b,c,d,*}

^a University of São Paulo (USP), School of Odontology of Ribeirão Preto, Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology, Av. Café S/N, 14040-904 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^b USP, Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), Brazil

^c USP, Medical School of Ribeirão Preto, Department of Physiology, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

^d USP, Medical School of Ribeirão Preto, Department of Pharmacology, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2016

Revised 20 June 2016

Accepted 22 June 2016

Available online 29 June 2016

Keywords:

Cannabinoid

LID

AIMs

Neuroinflammation

Anandamide

CB1

TRPV-1

PPAR gamma

ERK 1/2

COX-2

NF-κB

pACh3

ABSTRACT

Pharmacological manipulation of the endocannabinoid system represents a promising therapy to alleviate L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA)-induced dyskinesia (LID) in Parkinson's disease (PD). Our aim was to verify whether cannabidiol (CBD), the major non-psychoactive constituent of *Cannabis sativa*, modifies LID. To this end, the present study employed the 6-hydroxydopamine-neurotoxin model in male C57/BL6 mice to reproduce the pattern of cell death present in PD patients. Unilateral striatal lesioned mice received L-DOPA for 21 days, developing severe axial, limb, locomotor and orofacial abnormal involuntary movements (AIMs). Following that, the animals were treated with CBD (intraperitoneally) before L-DOPA for three days, alone or in combination with antagonists of the Transient Receptor Potential Vanniloid-1 (TRPV-1), cannabinoid type 1 (CB1) or Peroxisome Proliferator-Activated type gamma (PPARγ) receptors. Nor CBD or any of the antagonists individually were effective in decreasing AIMs. CBD administered with the TRPV-1 antagonist capsazepine (CPZ) reduced AIMs. Treatment with arachidonoyl-serotonin (AA-5-HT), an inhibitor of the enzyme responsible for anandamide metabolism fatty acid amide hydrolase (FAAH) and a TRPV-1 blocker, reproduced these findings. The CB1 receptor antagonist AM251 or the PPARγ receptor antagonist GW9662 selectively reversed the antidyskinetic effect of CPZ + CBD, with AM251 decreasing limb and orofacial AIMs and GW9662 reducing axial AIMs. The decrease of LID by CPZ + CBD was associated with a reduction in the molecular markers phospho-acetylated histone H3 and phosphorylated extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2. L-DOPA treatment in hemiparkinsonian mice increased the pro-inflammatory markers cyclooxygenase-2 and nuclear factor-kappa B in the lesioned striatum. These markers were also decreased by CPZ + CBD treatment. Our study indicates that CBD, together with a TRPV-1 antagonist, reduces LID by acting on CB1 and PPARγ receptors and reducing the expression of the inflammatory markers cyclooxygenase-2 and nuclear factor-kappa B.

© 2016 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The dopamine precursor L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) remains the most efficient pharmacotherapy for the motor symptoms of Parkinson's disease (PD), at least in the first and middle phases of the disorder (Carlsson, 2002; Connolly and Lang, 2014). However, L-DOPA administration only ameliorates the symptoms, without delaying/arresting the progress of this disorder. Moreover, chronic treatment with L-DOPA induces several non-motor and motor complications, including L-DOPA-induced dyskinesia (LID; Marsden, 1994). As a highly disabling side effect of L-DOPA treatment, LID is frequently

described as more debilitating than PD itself. It affects approximately 50–80% of PD patients in a brief period after the onset of treatment (Jenner, 2008; Obeso et al., 2000) and is characterized by a combination of dystonic and choreiform movements occurring at the time when L-DOPA is providing the maximal relief of parkinsonian symptoms ("on" dyskinesia; Lundblad et al., 2005; Marconi et al., 1994).

Although the detailed mechanisms underlying the development of LID are not completely understood, the pulsatile stimulation of dopamine receptors in the striatal spiny neurons after the 90-min cycle of the rise and fall in L-DOPA concentration is believed to induce its onset (Rascol et al., 2015). In addition to dopamine receptors stimulation, LID is accompanied by a series of molecular events within the basal ganglia, such as enhancement of cyclic adenosine monophosphate (cAMP) levels and a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein (DARPP-32) (Chase, 1998; Corvol et al., 2004; Ruiz-DeDiego et al., 2015a, Santini et al., 2007) and increase in

* Corresponding author at: University of São Paulo, School of Odontology, Department of Morphology, Physiology and Basic Pathology; Campus Ribeirão Preto, SP, Brazil.

E-mail address: eadelbel@forp.usp.br (E. Del-Bel).

Available online on ScienceDirect (www.sciencedirect.com).

Research

Cite this article: Bortolanza M, Padovan-Neto FE, Cavalcanti-Kiwiatkoski R, dos Santos-Pereira M, Mitkovski M, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. 2015 Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? *Phil. Trans. R. Soc. B* **370**: 20140190.
<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0190>

Accepted: 13 April 2015

One contribution of 16 to a discussion meeting issue 'Release of chemical transmitters from cell bodies and dendrites of nerve cells'.

Subject Areas:

behaviour, neuroscience, physiology

Keywords:

COX2, prostaglandin H-synthase, neuroinflammation, striatum interneurons, volume transmission, extrasynaptic signalling

Author for correspondence:

Elaine Del-Bel
e-mail: eadelbel@forp.usp.br

[†]This work is dedicated to Prof. John Nicholls and Prof. Francisco Fernandez De Miguel for their dedication to science and their faithful encouragement.

Electronic supplementary material is available at <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0190> or via <http://rstb.royalsocietypublishing.org>.

Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA?[†]

Mariza Bortolanza^{1,2}, Fernando E. Padovan-Neto^{2,3},
Roberta Cavalcanti-Kiwiatkoski^{2,4}, Maurício dos Santos-Pereira^{2,4},
Miso Mitkovski⁶, Rita Raisman-Vozari⁵ and Elaine Del-Bel^{1,2,3,4}

¹School of Odontology of Ribeirão Preto, Department of Morphology, University of São Paulo (USP), Physiology and Basic Pathology, Av. Café S/N, 14040-904, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

²Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Department of Behavioural Neurosciences, Av. Bandeirantes 3900, 14049-900 Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁴Medical School, Department of Physiology, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Institut de Cerveau et de la Moelle Epinière, Sorbonne Université UPMC UMR75 INSERM U1127, CNRS UMR 7225, Paris, France

⁶Light Microscopy Facility, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Hermann-Rein-Str. 3, 37075 Göttingen, Germany

Inflammatory mechanisms are proposed to play a role in L-DOPA-induced dyskinesia. Cyclooxygenase-2 (COX2) contributes to inflammation pathways in the periphery and is constitutively expressed in the central nervous system. Considering that inhibition of nitric oxide (NO) formation attenuates L-DOPA-induced dyskinesia, this study aimed at investigating if a NO synthase (NOS) inhibitor would change COX2 brain expression in animals with L-DOPA-induced dyskinesia. To this aim, male Wistar rats received unilateral 6-hydroxydopamine microinjection into the medial forebrain bundle were treated daily with L-DOPA (21 days) combined with 7-nitroindazole or vehicle. All hemi-Parkinsonian rats receiving L-DOPA showed dyskinesia. They also presented increased neuronal COX2 immunoreactivity in the dopamine-depleted dorsal striatum that was directly correlated with dyskinesia severity. Striatal COX2 co-localized with choline-acetyltransferase, calbindin and DARPP-32 (dopamine-cAMP-regulated phosphoprotein-32), neuronal markers of GABAergic neurons. NOS inhibition prevented L-DOPA-induced dyskinesia and COX2 increased expression in the dorsal striatum. These results suggest that increased COX2 expression after L-DOPA long-term treatment in Parkinsonian-like rats could contribute to the development of dyskinesia.

1. Introduction

Parkinson's disease is an incurable neurodegenerative disease. The incapacitating motor symptoms are mainly due to the degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra compacta, leading to a loss of striatal dopaminergic fibres [1]. Dopamine is a key transmitter in the basal ganglia, yet dopamine transmission does not conform to several aspects of the classic synaptic doctrine [2]. In the striatum, axonal release sites are controversial, with evidence for dopamine varicosities that lack postsynaptic specializations. Instead, dopamine acts on extrasynaptic receptors and transporters. The dopamine precursor L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) represents the most effective and best-tolerated compound for therapy for Parkinson's disease. Unfortunately, in many cases, L-DOPA treatment has to be suspended because of its side effects, which include motor fluctuations, dyskinesia (abnormal involuntary movements) and psychiatric problems [3]. Currently, the molecular events that underlie these adverse effects are poorly understood.

In vivo brain imaging of Parkinson's disease patients reveals an association between widespread microglial activation and the pathological process [4–6]

L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key elements?

Elaine Del-Bel^{1,2,3,4} | Mariza Bortolanza^{1,2} | Maurício Dos-Santos-Pereira^{1,2,3} | Keila Bariotto^{1,2,4} | Rita Raisman-Vozari⁵

¹Department of MFPB-Physiology, FORP, Campus USP, University of São Paulo, Av. Café, s/no, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil

²Center for Interdisciplinary Research on Applied Neurosciences (NAPNA), São Paulo, Brazil

³Department of Physiology, FMRP, São Paulo, Brazil

⁴Department of Neurology and Behavioral Neuroscience, FMRP, Campus USP, University of São Paulo, Av. Bandeirantes 13400, Ribeirão Preto, SP 14049-900, Brazil

⁵INSERM UMR 1127, CNRS UMR 7225, UPMC, Thérapeutique Expérimentale de la Neurodégénérescence, Hôpital de la Salpêtrière-ICM (Institut du cerveau et de la moelle épinière), Paris, France

Correspondence

Elaine Del-Bel, Department of MFPB-Physiology, FORP, Campus USP, University of São Paulo, Av. Café, s/no, Ribeirão Preto, SP 14040-904, Brazil.
Email: eadelbel@forp.usp.br

Abstract

Inflammation in Parkinson's disease (PD) is a new concept that has gained ground due to the potential of mitigating dopaminergic neuron death by decreasing inflammation. The solution to this question is likely to be complex. We propose here that the significance of inflammation in PD may go beyond the nigral cell death. The pathological process that underlies PD requires years to reach its full extent. A growing body of evidence has been accumulated on the presence of multiple inflammatory signs in the brain of PD patients even in very late stages of the disease. Because neuron-microglia-astrocyte interactions play a major role in the plasticity of neuronal response to L-DOPA in post-synaptic neurons, we focused this review on our recent results of L-DOPA-induced dyskinesia in rodents correlating it to significant findings regarding glial cells and neuroinflammation. We showed that in the rat model of PD/L-DOPA-induced dyskinesia there was an increased expression of inflammatory markers, such as the enzymes COX2 in neurons and iNOS in glial cells, in the dopamine-denervated striatum. The gliosis commonly seen in PD was associated with modifications in astrocytes and microglia that occur after chronic treatment with L-DOPA. Either as a cause, consequence, or promoter of progression of neuronal degeneration, inflammation plays a role in PD. The key aims of current PD research ought to be to elucidate (a) the time sequence in which the inflammatory factors act in PD patient brain and (b) the mechanisms by which neuroinflammatory response contributes to the collateral effects of L-DOPA treatment.

KEYWORDS

COX2, dorsal striatum, glial cells, neuroprotection, nitric oxide

1 | INTRODUCTION

Parkinson's disease (PD) is a complex multisystem adult-onset neurodegenerative disease (Hirsch, Jenner, & Przedborski, 2013; Obeso et al., 2010; Toulouse & Sullivan, 2008) of unknown etiology with a myriad of pathological features and symptoms that affect organs throughout the body (Braak & Del Tredici, 2008). It comprises a chain of irreversible alterations in brain function leading to a relatively selective progressive death of neurons in the nigrostriatal dopaminergic pathway (Damier, Hirsch, Agid, & Graybiel, 1999; Hirsch et al., 2013; Obeso et al., 2010). PD is a pathology that develops over many years and where the gradual dopaminergic denervation depletes the striatum of adequate levels of dopamine, triggering complex functional modifications within the basal ganglia circuitry. The degenerative process

results in an impairment of voluntary movement execution, which translates into the PD motor symptoms: tremor, rigidity, and bradykinesia (Blandini, Nappi, Tassorelli, & Martignoni, 2000), which worsen over time as dopamine denervation progresses. Nonmotor manifestations (cognitive and psychiatric dysfunction, autonomic dysfunctions, sleep disorders, gastrointestinal dysfunction; for review see Napier et al., 2015) in some cases can precede the onset of the motor manifestations and further worsen the quality of life of PD patients (Gallagher, Lees, & Schrag, 2010; Lim & Lang, 2010; O'Sullivan et al., 2008; Zesiewicz, Sullivan, & Hauser, 2006).

The etiology of PD remains elusive and the precise mechanisms that cause this disease stay to be identified (Hirsch et al., 2013; Janovic, 2008; Obeso et al., 2010). While genes are likely to modify the risk for PD development, genetic mutations account for only a small