**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS
E CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

DANIELE PEREIRA FERRARI

**Influência do interferon- γ sobre o parkinsonismo, na
discinesia induzida pelo tratamento com L-DOPA e na expressão
de fatores neuroinflamatórios**

Ribeirão Preto

2020

DANIELE PEREIRA FERRARI

**Influência do interferon- γ sobre o parkinsonismo, na discinesia
induzida pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de fatores
neuroinflamatórios**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Neurociências

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz
Guimarães

Ribeirão Preto

2020

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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferrari, Daniele Pereira

Influência do interferon- γ sobre o parkinsonismo, na discinesia induzida pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de fatores neuroinflamatórios. Ribeirão Preto, 2020.

130p. : il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurociências.

Orientadora: Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

1. Doença de Parkinson. 2. Neuroinflamação. 3. IFN- γ . 4. iNOS. 5. Discinesia.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ferrari, Daniele Pereira. Influência do interferon- γ sobre o parkinsonismo, na discinesia induzida pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de fatores neuroinflamatórios.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Aprovada em: _____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elaine Aparecida Del Bel Belluz Guimarães

Instituição: FORP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr.:

Instituição:

Assinatura: _____

Profa. Dra.:

Instituição:

Assinatura: _____

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não
é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”.*

(Madre Teresa de Calcuta)

Não deixe para fazer amanhã o que você pode fazer hoje!

Elaine Del Bel

A duas mulheres que me inspiraram.

Dona Leonilda, que tinha doença de Alzheimer.

Minha primeira paciente.

Dona Luzia, que tem doença de Parkinson.

Que me motiva todo dia.

Que ajudou a me criar e sempre acreditou em mim.

Minha avó.

AGRADECIMENTOS

O caminho até aqui foi longo e tortuoso. Foram dias de muito esforço e aprendizado. Mas tive a sorte de ter pessoas que o deixaram mais leve e feliz. Esse espaço vai ser dedicado para todos vocês.

Três mulheres foram essenciais na minha trajetória de vida e contribuíram, cada uma do seu jeito, pra eu ter chegado nesse momento. Os primeiros agradecimentos são para elas.

À minha mãe, que é a pessoa mais importante do mundo pra mim. Me mostrou o amor incondicional. Que sempre me incentivou a buscar meus sonhos, sem nunca me pressionar. Que foi também financiadora desse projeto por muito tempo. Que me ensinou a ser independente e trabalhadora. Que me deu todo apoio para chegar aqui. Meu porto seguro.

À minha vó, pessoa mais carinhosa que já conheci. Que foi essencial na minha educação. Que me faz sentir a pessoa mais especial do mundo. Que já enfrentou muitos desafios e conseguiu criar uma família (bem grande) sozinha, me ensinando o que é ter força. Que sempre se preocupa com minha saúde e bem-estar.

À minha chefe, que me aceitou em seu laboratório (mesmo sendo psicóloga!). Mulher forte, batalhadora e determinada. Que não abaixa a cabeça e sabe fazer-se ser ouvida. Verdadeiro *girl power*. Uma cientista inspiradora que me ensinou muito. Muito obrigada por todos os puxões de orelha e conselhos. Muito obrigada por todas as oportunidades. Muito obrigada pela dedicação e atenção a este projeto. Espero ser um dia corresponder às suas expectativas.

Aos meus colegas de laboratório. Vocês foram tão importantes. Muito obrigada pela companhia de todo dia, pela amizade, por me ter dado um lar. Obrigada pelo apoio científico e emocional. Só a gente sabe as loucuras que nós suportamos e seguimos firmes. Obrigada pelo apoio técnico e pelos conselhos de vida. Obrigada pelos almoços, bolos de aniversário e saidinhas de vez em quando. Pelos momentos bons e pelos momentos ruins, que nos fortaleceram. Vocês foram minha família aqui em RP. Vocês são demais!

À minha irmãzinha mais velha. O parágrafo acima é todo pra você também, mas você merece uma atenção especial. Você me acolheu, me ouviu, me ajudou, me incentivou. Sinceramente, não teria sido o mesmo sem você. Muito obrigada pelas aventuras e histórias para contar. Muito obrigada por ser minha parceira e pelas oportunidades que você me deu. Melhor professora que essa Odonto poderia ter ganhado. Te espero nas colaborações! E também à minha outra irmãzinha/(sobrinha), que sempre soube me ouvir e me dar os

melhores conselhos. Obrigada pelo carinho. Quero ser você quando eu crescer. Obrigada vocês duas por tudo!

Ao meu eterno melhor amigo. Maior *personal cheerleader* que alguém poderia ter. Que aprendeu sobre doença de Parkinson e discinesia pelas várias conversas que ouviu nas mesas de bar, com muita paciência. Que até já colocou a mão na massa nesse projeto. Que sempre acreditou e me motivou, mesmo quando nem eu mesma acreditava que daria certo. Meu melhor reforço positivo. Meu companheiro de sempre.

À minha família. Sempre perguntando como estava a escola ou quando eu iria começar a trabalhar. Muito obrigada a todos pelo incentivo e pelo carinho.

Às pessoas especiais que conheci no estágio na Alemanha. Ao meu orientador Walter Stühmer, por ter aberto o seu laboratório para mim e ter me dado todo o apoio para meu estágio. À Sabine Martin, viele danke, dass du mich unterrichtet hast und so geduldig und nett zu mir bist. À Ute, danke schön für ihre hilfe! Ao Prof. Tiago Outeiro, pelas reuniões de laboratório e disponibilidade. Aos queridos colegas de laboratório, obrigada pela companhia e pelos almoços. À família Pardo, muchas gracias por ser tan cariñosos! À Fernandinha, que me acolheu naquele país tão gelado. Bis bald!

Ao pessoal do biotério e as moças da limpeza, que também têm função essencial para realização desse trabalho.

Aos professores da minha banca. Pela gentileza e disponibilidade. Pela leitura atenciosa e pelas sugestões e correções.

À Luci, secretária do programa, que sempre foi muito atenciosa e prestativa.

À minha querida UFSCar, Psico012 e LPA, pois minha formação não se iniciou e nem terminará aqui.

A todos os pacientes da Doença de Parkinson, que me inspiraram por todo o caminho.

Aos animais sacrificados em nome da ciência.

À FAPESP e ao CNPq, concessão da bolsa de mestrado e a CAPES, pelo apoio financeiro.

À Deus, que me ilumina e cuida de mim.

RESUMO

Ferrari, D. P. **Influência do interferon- γ sobre o parkinsonismo, na discinesia induzida pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de fatores neuroinflamatórios.** 2020. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, cuja causa ainda é desconhecida. O tratamento mais efetivo para os sintomas motores da DP é por meio da administração de L-DOPA. A cronicidade desse tratamento leva ao desenvolvimento de discinesia induzida por L-DOPA (LID), caracterizado por movimentos involuntários anormais (AIMs). Observou-se no estriado lesionado de animais parkinsonianos com discinesia a presença de células gliais ativadas e o aumento da expressão de sintase do óxido nítrico induzida (iNOS), sugerindo o envolvimento de neuroinflamação na fisiopatologia da DP e da discinesia. A transcrição de iNOS é dependente de citocinas pró-inflamatórias, como o interferon- γ (IFN- γ). O IFN- γ pode ativar micróglia e de astrócitos. Foi observado o aumento da produção desta citocina no plasma e no cérebro de pacientes com DP, sugerindo sua participação na doença. Além disso, animais nocaute para IFN- γ apresentaram neuroproteção contra degeneração de neurônios dopaminérgicos no modelo de MPTP e paraquat, mas ainda não se conhecia sua influência sobre a LID. O objetivo deste estudo foi investigar se a deficiência de IFN- γ interfere sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos promovida pela neurotoxina 6-OHDA, no desenvolvimento da discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA e na expressão de marcadores de neuroinflamação. No primeiro experimento analisamos a interferência do IFN- γ na lesão unilateral por 6-OHDA. Camundongos IFN- γ /KO e WT foram microinjetados com 6-OHDA no estriado e sacrificados 1, 3, 7 ou 21 dias após a cirurgia. A análise da imunoreatividade para enzima tirosina hidroxilase (TH) no estriado e na SNc indicou início da lesão dopaminérgica desde o primeiro dia após microinjeção, em ambas estruturas, com rápida progressão até o 21º dia, chegando a cerca de 85% no estriado e de 83% na SNc. Não houve diferença no desenvolvimento da lesão entre os grupos de animais. No segundo experimento, camundongos WT e IFN- γ /KO hemiparkinsonianos, foram tratados com L-DOPA por 21 dias. A análise dos AIMs indicou altos níveis de discinesia desde o primeiro dia de tratamento, que perdurou até o 21º dia, sendo semelhante entre os animais WT e IFN- γ /KO. A lesão da via nigroestriatal foi confirmada pelo teste do cilindro e imunohistoquímica para TH, indicando não haver diferença entre os grupos de animais. Foi observado maior número de neurônios TH⁺ no estriado lesionado dos animais IFN- γ /KO tratados com L-DOPA, em comparação aos animais WT. A análise da expressão de FosB no estriado não indicou diferenças entre os animais discinéticos. Os animais IFN- γ /KO tratados com L-DOPA apresentaram aumento da expressão de iNOS, Iba-1 (marcador de micróglia) e GFAP (marcador de astrócitos) no estriado lesionado, em comparação aos animais WT tratados com L-DOPA. A análise da morfologia indicou reatividade das células da glia no estriado lesionado. Foi encontrada correlação positiva entre a intensidade da discinesia e a expressão de micróglia no estriado de animais WT e IFN- γ /KO. O IFN- γ parece não interferir na lesão dopaminérgica por 6-OHDA ou na LID. Entretanto, sua ausência contribui para alterações das reações inflamatórias no estriado lesionado após tratamento com L-DOPA.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, Neuroinflamação, IFN- γ , iNOS, Discinesia.

ABSTRACT

Ferrari, D.P. **Involvement of interferon- γ on Parkinsonism, L-DOPA-induced dyskinesia and expression of neuroinflammatory elements.** 2020. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Parkinson's disease (PD) is characterized by the loss of nigrostriatal dopaminergic neurons, which cause is still unknown. The most effective treatment for PD motor symptoms is through the administration of L-DOPA. The chronicity of this treatment leads to the development of L-DOPA-induced dyskinesia (LID) characterized by abnormal involuntary movements (AIMs). In the lesioned striatum of parkinsonian and dyskinetic animals, the presence of activated glial cells and increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) suggested the involvement of neuroinflammation in the pathophysiology of PD and dyskinesia. iNOS transcription is dependent on proinflammatory cytokines, including interferon- γ (IFN- γ). IFN- γ is a potent activator of both microglia and astrocytes, and it was observed increased levels of this cytokine on the plasma and brain of PD patients, suggesting its potential role in PD. The influence of IFN- γ on LID has not been studied yet. This study aimed to analyze the participation of IFN- γ on 6-OHDA-induced parkinsonism, on LID development and expression of neuroinflammatory mediators. In the first experiment, WT and IFN- γ /KO received unilateral injections of 6-OHDA into the striatum and were sacrificed after 1, 3, 7, or 21 days. The analysis of immunoreactivity for tyrosine hydroxylase (TH) in the striatum and SNc indicated the starting of dopaminergic lesion since the first day after microinjection in both structures with rapid progression until the 21st day, reaching about 85% in the striatum and 83% in SNc. There was no difference in the development of the lesion between the animal groups. In the second experiment, hemiparkinsonian WT and IFN- γ /KO mice were treated with L-DOPA for 21 days. The analysis of AIMs indicated high levels of dyskinesia from the first day of the treatment, which was stable until the 21st treatment day, being similar between WT and IFN- γ /KO groups. The nigrostriatal pathway lesion was confirmed by the cylinder test and immunohistochemistry for TH and indicated no difference between the groups. Higher expression of TH+ neurons was observed in the lesioned striatum of IFN- γ /KO animals treated with L-DOPA, compared to the WT group. The FosB expression analysis in the striatum did not indicate differences between dyskinetic animals. The L-DOPA treated IFN- γ /KO animals showed increased expression of iNOS, Iba-1 (microglia marker), and GFAP (astrocyte marker) in the lesioned striatum, compared to L-DOPA treated WT animals. Morphology analysis indicated glial cell reactivity in the lesioned striatum. A positive correlation was found between the intensity of dyskinesia and the expression of microglia in WT and IFN- γ /KO striatum. IFN- γ does not appear to interfere with dopaminergic degeneration induced by 6-OHDA or in LID development. However, its deficit contributes to alterations in neuroinflammatory reactions in the lesioned striatum after treatment with L-DOPA.

Keywords: Parkinson's disease, Neuroinflammation, IFN- γ , iNOS, dyskinesia.

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA- 6-hidroxidopamina
7-NI- 7-nitroindazol
AIM- Movimentos Involuntários Anormais
AP1- proteína ativadora-1
BDNF- Fator neurotrófico derivado do cérebro
BHE- Barreira hematoencefálica
COMT- catecol-orto-metil-transferase
COX-2- Ciclo-oxigenase-2
DA- Dopamina
DAT- Transportador de dopamina
DOI- densidade óptica integrada
DOPAC- ácido 3,4-diidroxifenilacético
ELISA- ensaio de imunoabsorção enzimática
ERK- quinase regulada pela sinalização extracelular
GDNF- Fator neurotrófico derivado da glia
GPI- globo pálido interno
GPe- globo pálido externo
HVA- ácido homovanílico
IFN- γ - Interferon- γ
IL- interleucina
iNOS- sintase do óxido nítrico induzida
IRF1- fator regulador de interferon-1
L-DOPA- l-3,4-dihidroxifenilalanina
LID- discinesia induzida por L-DOPA
LPS- lipopolissacarídeo
MAO- monoamina-oxidase

MAPK- Proteína-quinase ativada por mitógenos

MPTP- 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NF- κ B- factor nuclear kappa B

nNOS- sintase do óxido nítrico neuronal

NO- óxido nítrico

NST- núcleo subtalâmico

PFA- paraformaldeído

PTX- pentoxifilina

ROS- espécies reativas de oxigênio

RNS- espécies reativas de nitrogênio

SNC- sistema nervoso central

SNC- substância negra compacta

SNr- substância negra reticulada

TGF β -1- fator de crescimento transformador beta-1

TH- Tirosina Hidroxilase

TMB- tetrametilbenzidina

TNF- α - Fator de necrose tumoral- α

VMAT2- Transportador vesicular de monoamina 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Via de síntese, armazenamento, liberação e receptação de DA	20
Figura 2: Circuitos motores dos gânglios da base	21
Figura 3: Degeneração da via nigroestriatal	22
Figura 4: Mecanismos que estimulam a ativação sustentada da micróglia e contribuem para a neurodegeneração na DP	27
Figura 5: Resposta neuroinflamatória e estresse oxidativo na DP.....	29
Figura 6: Transdução do sinal do IFN- γ em astrócitos humanos.....	32
Figura 7: Categorias de AIMs em camundongos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA	41
Figura 8: Regiões e áreas analisadas do estriado e SNc de camundongos	43
Figura 9: Protocolo de análise morfológica de micróglia.	44
Figura 10: Protocolo de análise morfológica de astrócitos.	45
Figura 11: Linha temporal representativa do experimento 1: time-course da lesão com 6-OHDA.	46
Figura 12: Linha temporal representativa do procedimento geral do experimento 2.	46
Figura 13: Avaliação da porcentagem de imunorreatividade para TH no estriado e na SNc após injeção de 6-OHDA no decorrer de 21 dias.	51
Figura 14: Fotomicrografias representativas da lesão dopaminérgica por 6-OHDA no estriado.	52
Figura 15: Fotomicrografias representativas da lesão dopaminérgica por 6-OHDA na SNc.	52
Figura 16: Análise temporal dos níveis de IFN- γ após a microinjeção de 6-OHDA.	53
Figura 17: Avaliação do uso dos membros anteriores após microinjeção de 6-OHDA	55
Figura 18: Avaliação temporal das discinesias	57
Figura 19: Curva temporal de avaliação de discinesia em um dia de tratamento	58

Figura 20: Avaliação da lesão por 6-OHDA no estriado e SNc	60
Figura 21: Fotomicrografias representativas da perda de fibras TH+ no estriado.....	61
Figura 22: Fotomicrografias representativas da perda de fibras TH+ na SNc.	62
Figura 23: Fotomicrografias de neurônios imunorreativos para TH no estriado lesionado após o tratamento com L-DOPA.....	63
Figura 24: Análise da expressão de FosB no estriado lesionado em animais parkinsonianos.	64
Figura 25: Análise da expressão de iNOS no estriado em animais parkinsonianos e discinéticos	65
Figura 26: Análise da morfologia da micróglia no estriado lesionado e não lesionado após tratamento crônico com L-DOPA.	68
Figura 27: Fotomicrografias representativas da imunomarcação de Iba-1	69
Figura 28: Análise da morfologia de astrócitos no estriado lesionado e não lesionado após tratamento crônico com L-DOPA.....	71
Figura 29: Fotomicrografias representativas da imunomarcação de GFAP.	72
Figura 30: Correlação entre escores de discinesia de expressão de iNOS, micróglia e GFAP.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de consumíveis comprados para a realização dos experimentos.	37
Tabela 2: Lista de aparelhos utilizados no decorrer dos experimentos.....	37
Tabela 3. Avaliação atividade locomotora espontânea no Campo Aberto após lesão com 6-OHDA em animais WT e IFN- γ /KO.....	54

MATERIAL SUPLEMENTAR

Figura Material Suplementar 1: Avaliação comportamental em camundongos WT e IFN- γ /KO após microinjeção de 6-OHDA no estriado direito	93
Figura Material Suplementar 2: Avaliação do uso dos membros anteriores pelo teste do cilindro em camundongos após microinjeção de 6-OHDA no estriado direito	94
Figura Material Suplementar 3: Avaliação temporal das discinesias e da locomoção	95

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS.....	35
MATERIAL E MÉTODOS	
Materiais utilizados	37
Animais.....	39
Drogas.....	39
Lesão unilateral por 6-OHDA.....	39
Testes comportamentais.....	40
Tratamento com L-DOPA e avaliação dos Movimentos Involuntários Anormais.....	40
Análise molecular.....	41
Análise de imagens.....	43
Delineamento experimental.....	45
Análise estatística.....	47
RESULTADOS	
Experimento 1: Análise da interferência do IFN- γ na lesão unilateral por 6-OHDA...	49
Experimento 2: Análise da ausência IFN- γ sobre a indução da discinesia pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de iNOS e células da glia em animais hemiparkinsonianos.....	54
DISCUSSÃO.....	75
CONCLUSÃO.....	90
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
APÊNDICE.....	110

INTRODUÇÃO

Dopamina

A dopamina (DA) é um neurotransmissor liberado por neurônios do mesencéfalo, e está associada à regulação de processos essenciais como movimento, memória e aprendizagem, reforço e abuso de drogas (NIEOULLON, 2002; SCHULTZ, 2007; BERKE, 2018). É sintetizada a partir do aminoácido tirosina, que é convertido em L-DOPA pela Tirosina Hidroxilase (TH), enzima passo limitante da reação e utilizada como marcadora de neurônios e terminais dopaminérgicos. A L-DOPA é então convertida rapidamente em DA, pela enzima descarboxilase de ácidos aromáticos (AADC; IVERSEN; IVERSEN, 2007).

Após a sua síntese, a DA é armazenada em vesículas pelo transportador vesicular de monoaminas (VMAT2). A sua liberação ocorre por meio de exocitose das vesículas na fenda sináptica, processo dependente de Ca^{2+} e consequente do potencial de ação. A DA pode ligar-se a receptores pré e pós-sinápticos. Os receptores pós-sinápticos se classificam em cinco subtipos, divididos em duas classes de famílias: D1, de ação excitatória, que inclui os subtipos D1 e D5; D2, de ação inibitória, que inclui os subtipos D2, D3 e D4. Os autorreceptores presentes no neurônio pré-sináptico são do tipo D2 e regulam a liberação de DA (SULZER et al., 2010). A DA é recaptada para o interior dos neurônios pelo transportador de DA (DAT), e no citosol pode ser degradada em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) e ácido homovanílico (HVA) pela ação das enzimas monoamina-oxidase (MAO) e catecol-orto-metil-transferase (COMT; IVERSEN; IVERSEN, 2007; Figura 1).

Existem quatro vias de liberação dopaminérgica: nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular. A via nigroestriatal concentra a maior parte de DA do encéfalo. Ela se projeta dos corpos celulares da substância negra (SN) até as terminações que inervam o núcleo caudado e putâmen, em conjunto denominados de estriado. O sistema de projeção nigroestriatal exerce profunda influência na estimulação do movimento intencional, que é regulado pelos núcleos da base (MAILMAN; HUANG; NICHOLS, 2001).

Figura 1. Via de síntese, armazenamento, liberação e recepção de DA. Modelo esquemático de neurônio dopaminérgico ilustrando o ciclo da vida da DA após o potencial de ação. AADC: descarboxilase de ácidos aromáticos. VMAT: transportador vesicular de monoaminas; DAT: transportador de DA; MAO: monoamina oxidase; COMT: Catecol-O-metiltransferase. Adaptado de Weinstein et al. (2017).

Núcleos da base

Os núcleos da base se configuram como conjuntos de estruturas subcorticais que participam do controle adaptativo do comportamento motor, cognitivo e motivacional. São compostos pelas seguintes estruturas encefálicas: núcleo caudado, putâmen, globo pálido interno (GPi) e externo (GPe), substância negra compacta (SNc), substância negra reticulada (SNr) e núcleo subtalâmico (NST; ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989). O estriado e o globo pálido, juntamente com a substância negra e o núcleo subtalâmico, formam um circuito subcortical que conecta a maior parte das áreas corticais dos neurônios motores superiores do córtex pré-motor, motor primário e tronco encefálico (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989).

O estriado é considerado o núcleo de entrada para as aferências corticais, que são excitatórias (glutamatérgicas). Após o processamento das informações, elas chegam aos núcleos de saída, GPi e SNr, com projeções inibitórias (gabaérgicas) ao tálamo e então, excitatórias para o córtex. O controle do movimento é dado por dois circuitos dos núcleos da base, as vias direta e indireta, que trabalham de maneira paradoxal para estimular o movimento adequado ou inibir o inadequado (ALBIN; YOUNG; PENNEY, 1989; PHILLIPS

et al., 1993; Figura 2). A via direta conecta diretamente o estriado aos núcleos de saída, inibindo-os. Dessa forma, ela facilita o movimento pela desinibição do tálamo, que irá estimular as áreas corticais relacionadas ao movimento. No caso da via indireta, as projeções inibitórias do estriado vão até o GPe, se projetam ao NST também de maneira inibitória, e então chegam aos núcleos de saída, estimulando-os. Como resultante, o tálamo é inibido e deixa de estimular as áreas corticais relacionadas ao movimento, o que gera na inibição do movimento (WICHMANN; BERGMAN; DELONG, 2018).

A via dopaminérgica nigroestriatal pode controlar indiretamente o movimento pela sua ação nas vias direta e indireta. Originada da SNc, a DA chega ao estriado estimulando a via direta pela ação em receptores do tipo D1 e inibindo a via indireta pela ação em receptores do tipo D2, ambos presentes em neurônios espinhosos médios do estriado. A degeneração da via nigroestriatal gera intenso desarranjo no funcionamento dos núcleos da base. A perda da DA resulta na hiperestimulação da via indireta e na inibição da via direta, resultando nos sintomas motores da doença de Parkinson (DP; CALABRESI et al., 2014).

Figura 2. Circuitos motores dos gânglios da base. Ilustração esquemática das vias direta, indireta e modulação dopaminérgica sobre os núcleos da base para estimulação do movimento. Setas pretas: inibição; Setas vermelhas: excitação; Setas azuis: modulação dopaminérgica. Adaptado de Bravo (2014).

Doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, é incurável e acomete cerca de 1% da população acima de 60 anos, prevalecendo na população masculina (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Quando os sintomas da doença se estabelecem, cerca de 80% dos neurônios da SNc já sofreram degeneração (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; Figura 3).

Figura 3. Degeneração da via nigroestriatal. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal (em vermelho), demonstrando a pigmentação da substância negra compacta (SNc) em indivíduos normais. (B) Representação esquemática da via nigroestriatal em pacientes com DP, demonstrando a despigmentação da SNc que ocorre pela perda dos neurônios dopaminérgicos. Adaptado de Dauer e Przedborski (2003).

A DP é uma patologia motora hipocinética, manifestando-se nos pacientes como anormalidades no movimento, incluindo tremor de repouso, rigidez muscular, lentidão no movimento (bradicinesia), dificuldade em iniciar o movimento (acinesia), distúrbios da marcha e da postura (DEXTER; JENNER, 2013; SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). A DP é caracterizada por sintomas não motores, que podem aparecer até mesmo 10 anos antes da manifestação dos sintomas motores, e incluem distúrbios de sono, das funções autonômicas, dor, além de transtornos psiquiátricos como ansiedade e depressão (PONT-SUNYER et al., 2015; SCHRAG et al., 2015). Os sintomas característicos da DP podem acarretar na dificuldade de realização das atividades de vida diária do indivíduo e, portanto, na redução da sua qualidade de vida.

Na maioria dos pacientes não se conhece a causa exata da DP, embora alguns mecanismos para o seu desenvolvimento já tenham sido identificados (HIRSCH; JENNER; PRZEDBORSKI, 2013; JANKOVIC, 2008; OBESO et al., 2010). Apenas uma pequena porcentagem dos casos parece estar relacionada a fatores hereditários e mutação genética (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Enquanto isso, fatores ambientais e neuroinflamação parecem estar envolvidos na sua etiologia (DEXTER; JENNER, 2013). Fatores de risco associados ao aparecimento da DP incluem a exposição a pesticidas, como paraquat e rotenona (TANNER et al., 2011), e traumatismo craniano, que pode causar o rompimento da barreira hematoencefálica, inflamações de longa duração e disfunção mitocondrial (MARRAS et al., 2014).

A degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal é a característica crucial da DP, mas também existem outros mecanismos-chave relacionados na sua fisiopatologia. Em pacientes com DP, é encontrado a presença de agregados proteicos em neurônios dopaminérgicos remanescentes, chamados de copos de Lewy. Estes agregados estão presentes em outras doenças neurodegenerativas e são compostos principalmente da acumulação de fibras de α -sinucleína insolúveis, mas também incluem as proteínas ubiquitina e Tau (SPILLANTINI et al., 2007). Além disso, são pensados outros fatores que podem colaborar com o processo de neurodegeneração. São eles: disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, aumento da atividade da quinase 2 com repetição rica em leucina (LRRK2), entre outros eventos (ALDAKHEEL; KALIA; LANG, 2014; KALIA; LANG, 2015). A contribuição dos corpos de Lewy para a DP, bem como dos outros fatores citados, ainda não está bem estabelecida, contudo sugere-se que possam contribuir para citotoxicidade, resultando na morte dos neurônios dopaminérgicos.

Diversos modelos animais são utilizados para o estudo da DP. Entre eles, estão os modelos baseados em neurotoxinas que causam degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNc, tendo como resultado extensa disfunção motora nos animais. Um dos modelos mais utilizado em roedores é realizado a partir de lesão unilateral com 6-hidroxdopamina (6-OHDA) no estriado ou no feixe prosencefálico medial (SCHWARTING; HOUSTON, 1996; UNGERSTEDT, 1968). Por ter estrutura química semelhante à da DA, a 6-OHDA é recaptada por DAT e, uma vez no neurônio dopaminérgico, ela é oxidada, produzindo radicais livres que comprometem o funcionamento da mitocôndria, causando morte celular (Schwartzing & Houston, 1996). Alguns dias depois da cirurgia, já é observado depleção quase total de DA, juntamente com maior sensibilidade dos receptores pós-sinápticos dopaminérgicos no estriado ipsilateral à lesão (UNGERSTEDT, 1968).

L-DOPA e Discinesia

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva para qual ainda não foram desenvolvidas intervenções efetivas contra a depleção dopaminérgica. Dessa forma, os tratamentos mais utilizados buscam promover a melhora dos sintomas motores da doença. Nos estágios iniciais da DP e em pacientes mais jovens, é comum tratamento farmacológico por meio de agonistas dopaminérgicos ou por inibidores das enzimas MAO e COMT, que degradam a DA, de forma a inibir o seu metabolismo e aumentar a sua duração e disponibilidade. Entretanto, tais drogas não são muito eficazes para os sintomas, como o controle do tremor, e ainda provocam efeitos colaterais como náusea, hipotensão e alucinações (TARAKAD; JANKOVIC, 2017).

A L-DOPA, precursora da DA, ainda é considerada como tratamento mais eficaz, dentre os não invasivos, para o alívio dos sintomas motores da DP. Ela é comumente administrada em conjunto com um inibidor da AACD (como a carbidopa ou benserazida), de forma a impedir a conversão periférica de L-DOPA em DA. Pela ação da L-DOPA, são reduzidos sintomas mais comuns da DP, como o tremor de repouso, rigidez muscular e a lentidão de movimentos, além de promover melhora na caminhada e no equilíbrio dos pacientes (LEWITT, 2015; POEWE et al., 2017).

Entretanto, a administração contínua de L-DOPA causa o aparecimento de movimentos involuntários anormais incapacitantes, tipo distonia e coreia, caracterizados como discinesia induzida por L-DOPA (LID; MAZZELLA et al., 2005; RAJPUT et al., 2002). Em humanos, a estimativa é de que em cerca de 5 anos de tratamento com L-DOPA, 40% dos pacientes desenvolverão discinesia e, em 10 anos, esse número chegará em 90% dos pacientes (AHLSSKOG; MUENTER, 2001). A discinesia acarreta em piora da qualidade de vida dos indivíduos acometidos e, ao mesmo tempo em que trata a DP, se mostra como um obstáculo, pois é preciso reduzir as doses de L-DOPA após o aparecimento da discinesia, limitando o tratamento. Consequentemente, tornam-se necessários métodos alternativos que busquem a redução dos sintomas da DP, sem causar as complicações advindas do uso de L-DOPA.

Em modelos animais com lesão da via nigroestriatal (como no caso da 6-OHDA), o tratamento crônico com L-DOPA leva ao aparecimento de movimentos involuntários anormais (AIMs), envolvendo os músculos orofaciais, o tronco e os membros contralaterais à lesão, distinguidos dos comportamentos costumeiramente apresentados pelos animais (LUNDBLAD; PICCONI; CENCI, 2004; OBESO et al., 2010). Os AIMs mimetizam a

ocorrência da LID em humanos e podem ocorrer em cerca de 80% dos casos onde houve depleção dopaminérgica. Após 10 a 14 dias do tratamento crônico com L-DOPA, a severidade dos AIMs parece atingir um platô. Uma vez estabelecida, os AIMs se manifestam a cada aplicação da droga (CENCI; LUNDBLAD, 2007).

O grau de denervação dopaminérgica (medido pela severidade dos sintomas da DP), as doses de L-DOPA utilizadas no tratamento e a duração do mesmo parecem ser fatores de risco para o aparecimento da LID (DI MONTE et al., 2000; POEWE et al., 2017). Os mecanismos subjacentes à LID incluem fatores pré e pós-sinápticos. A denervação da via nigroestriatal causa redução da capacidade de armazenamento de DA e sua liberação desregulada. Ao mesmo tempo ocorre a sensibilização de receptores dopaminérgicos, juntamente com a estimulação intermitente e de alta intensidade desses receptores promovida pela administração de L-DOPA (KAMPEN; STOESSL, 2003; POEWE et al., 2017). Além disso, a administração errática de L-DOPA, bem como a variabilidade na sua absorção e no transporte da barreira hematoencefálica, também desempenha um papel importante no desenvolvimento das complicações motoras da LID (POEWE et al., 2017).

Na ausência de neurônios dopaminérgicos, outros neurônios que sintetizam a AADC (como por exemplo, serotoninérgicos) poderiam converter a L-DOPA exógena em DA (CARTA; TRONCI, 2014). Entretanto, tal síntese ocorre sem um mecanismo regulatório eficaz e, como consequência, pode resultar em quadro de superestimulação dos receptores dopaminérgicos, levando a alterações hiperkinéticas do movimento (CARTA; TRONCI, 2014; CENCI, 2014). A injeção de agonistas 5-HT_{1A} e 5-HT_{1B} (que se ligam à autorreceptores serotoninérgicos, controlando a sua liberação) reduziram significativamente os níveis extracelulares de DA no estriado, após a injeção de L-DOPA, além de atenuar os níveis de movimentos anormais involuntários (LINDGREN et al., 2010). Lesões em neurônios serotoninérgicos foram capazes de diminuir discinesia em ratos parksonianos tratados com L-DOPA ou mesmo bloquear o seu aparecimento em ratos não-discinéticos (CARTA et al., 2017).

A LID parece estar diretamente relacionada com uma série de mudanças neuroquímicas e moleculares no estriado lesionado. O tratamento com L-DOPA pode promover alterações na expressão de genes de resposta imediata, como FosB/ Δ FosB, produzidas pela ativação de receptores D1 (PADOVAN-NETO et al., 2013; PAVON et al., 2006), além da fosforilação da quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK) 1/2 (PAVON et al., 2006; WESTIN et al., 2007). Tais mudanças estão correlacionadas com a gravidade da discinesia apresentada, e simultaneamente à inibição da discinesia ocorreu a

diminuição da expressão de FosB/ Δ FosB (PADOVAN-NETO et al., 2013) e da fosforilação de ERK1/2 (WAN et al., 2017).

Neuroinflamação na DP

Processos neuroinflamatórios estão presentes e contribuem para muitas doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica e também na DP. Apesar de neuroinflamação ser um tópico amplamente estudado na DP, ainda não foi elucidado se os fatores neuroinflamatórios são causadores da degeneração da via nigroestriatal ou se aparecem posteriormente ao início da morte dos neurônios (TANSEY; GOLDBERG, 2010).

Inflamação compreende uma complexa cascata de respostas fisiológicas a estímulos nocivos do ambiente. No sistema nervoso central (SNC), são células da glia (microglia e astrócitos) as responsáveis pelas ações imunes. Desse modo, no caso de doenças neurodegenerativas, as alterações que ocorrem no cérebro podem iniciar respostas imunes, como a ativação das células da glia, e estimulam a liberação de citocinas, quimiocinas, prostaglandinas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS; ORTIZ et al., 2017).

A microglia está localizada em todo o cérebro e medula espinhal e compreende cerca de 15% do número total de células do SNC. Elas são as primeiras a responder ao estímulo nocivo e suas funções incluem limpeza dos agentes infecciosos, placas e neurônio e sinapses supérfluos ou danificados. Danos neurológicos, traumatismos cranianos, infecções ou neurotoxinas podem levar à ativação da microglia, causando a sua proliferação e liberação de citocinas (NEUMANN et al., 1998; HELMUT et al., 2011). Além das funções exercidas pela microglia, os astrócitos também desempenham papel fundamental nos mecanismos imunes. Eles migram até o local da injúria e desenvolvem hipertrofia, descrito pela sua morfologia como seu estado reativo (MCGEER; MCGEER, 2008). Os astrócitos secretam muitos fatores neurotróficos para os neurônios dopaminérgicos, como o Fator Neurotrófico Derivado da Glia (GDNF) e o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF; CHEN et al., 2006; LIN et al., 1993). Citocinas pró-inflamatórias são também importantes mediadores para o quadro neuroinflamatório/neurotóxico, por meio de dois mecanismos principais: diretamente pela ligação a receptores presentes em neurônios ou indiretamente pela ativação glial e expressão de fatores inflamatórios (HIRSCH; HUNOT, 2009).

A neurotoxicidade crônica, que persiste após uma injúria inicial (como no caso da DP) estimula a ativação de longa duração da microglia, além de sua proliferação e liberação

sustentada de fatores inflamatórios e neurotóxicos, como por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias interleucina 1- β (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α), além de ROS e RNS. O aumento dos níveis destas moléculas favorece o estresse oxidativo, e perpetuam o ciclo vicioso da inflamação, ativando células adicionais de micróglia e contribuindo para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos (ORTIZ et al., 2017; TANSEY; MCCOY; FRANK-CANNON, 2007; Figura 4).

Figura 4. Mecanismos que estimulam a ativação sustentada da micróglia e contribuem para a neurodegeneração na DP. Esquema do ambiente inflamatório auto-sustentado, causado pela ativação persistente da micróglia que pode causar ou ser iniciado pela morte dos neurônios dopaminérgicos na DP. Adaptado de Tansey, McCoy e Frank-Cannon (2007).

Apesar de fatores inflamatórios estarem presentes na maioria das doenças degenerativas, na DP eles parecem ter um efeito mais robusto na sua fisiopatologia. Ao contrário de neurônios do hipocampo ou do córtex, os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo apresentam maior sensibilidade às propriedades citotóxicas de citocinas (BLOCK; ZECCA; HONG, 2007). Além dos neurônios dopaminérgicos da SN estarem presentes em uma região com grande densidade de micróglia (LAWSON et al., 1990), eles

ainda expressam receptores para citocinas, como o TNF- α (BOKA et al., 1994), cujo receptor do tipo 1 está aumentado na DP (MOGI et al., 2000).

A hipótese de que processos inflamatórios possam contribuir para a progressão da DP é apoiada por evidências de estudos sobre as células da glia. Foi observado na SNc um aumento robusto da ativação de micróglia em pacientes com DP (MOGI et al., 1996; MCGEER; MCGEER, 2008), e em modelos experimentais da doença, como pela lesão dopaminérgica por 6-OHDA ou por 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP; (CZŁONKOWSKA et al., 1996; KOHUTNICKA et al., 1998). Este aumento da ativação de micróglia foi relacionado à extensão da perda de neurônios dopaminérgicos na SNc (CICCHETTI et al., 2002) e a inibição da sua ativação pode prevenir a morte destes neurônios (JACKSON-LEWIS et al., 2002). Também foi observado aumento de 30% na densidade de astrócitos na SNc em pacientes parkinsonianos post-mortem (DAMIER et al., 1993). Em modelos animais, foi encontrado astrogliose na SNc e estriado de roedores expostos à 6-OHDA (HE et al., 2001; RODRIGUES; GOMIDE; CHADI, 2001) e MPTP (BREIDERT et al., 2002).

Além disso, muitos estudos observaram aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo IL-2, IL-1 β , TNF- α e interferon- γ (IFN- γ), no estriado e SNc de pacientes com DP (MOGI et al., 1994; STYPUŁA et al., 1996). Interessantemente, o aumento dos níveis destas citocinas não foi relatado em áreas corticais. As citocinas IL-1 β , TNF- α e IFN- γ são conhecidas por induzirem a expressão das enzimas sintase do óxido nítrico induzida (iNOS; BOJE; RESEARCH; 1992; CHAO et al., 1996) e ciclooxigenase 2 (COX-2; VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998), ambas capazes de induzir toxicidade. Em especial a iNOS, é fonte de produção do óxido nítrico (NO), que pode reagir com superóxido vindo de células gliais ou neuronais e formar o peroxinitrito, que é altamente reativo e tóxico para as células.

Apesar de não estar completamente elucidado, estudos sugerem que as células periféricas do sistema imune também participam de respostas neuroinflamatórias presentes na DP. Uma vez que em pacientes com DP foi encontrado redução de função dos mecanismos que regulam a permeabilidade da barreira hematoencefálica (KORTEKAAS et al., 2005), é provável que a atividade neuroinflamatória no SNC seja influenciada pela infiltração anormal de células imunes periféricas, devido à disfunção na barreira. Foram encontradas alterações em marcadores inflamatórios periféricos, como aumento de TNF- α , IL-2 e IL-6 no soro de pacientes com DP (STYPUŁA et al., 1996; DOBBS et al., 1999). Além disso, no modelo de

degeneração dopaminérgica por MPTP, foi observado populações de células T na SNc em camundongos (BROCHARD et al., 2009; Figura 5).

Figura 5. Resposta neuroinflamatória e estresse oxidativo na DP. Exposição à neurotoxinas, dano cerebral ou infecção podem induzir neuroinflamação, ativando células da glia e, consequentemente, a liberação de citocinas pró-inflamatórias, gerando ambiente neurotóxico. Além disso, a barreira hematoencefálica pode estar comprometida, favorecendo a entrada de células imunes periféricas que vão potencializar a inflamação, gerando neurotoxicidade aos neurônios dopaminérgicos. Por sua vez, a morte neuronal pode favorecer a neuroinflamação, por ativar as células da glia. Adptado de Taylor, Main e Crack (2013).

Neuroinflamação na discinesia

Visto que pacientes com DP costumam estar em tratamento com L-DOPA ou outras medicações anti-parkinsonianas quando vão a óbito, não pode ser excluída a hipótese de que os tratamentos farmacológicos também contribuam para reação neuroinflamatória encontrada no cérebro desses pacientes (BOKA et al., 1994; SHIMOJI et al., 2009).

Anormalidades na neurotransmissão corticoestriatal, alterações pós-sinápticas e mudanças nos disparos de neurônios estão envolvidas na fisiopatologia da LID (BASTIDE et al., 2015; JENNER, 2008). A estimulação constante e não fisiológica de receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos (CALON et al., 2003; CHASE; BIBBIANI; OH, 2003),

pode induzir níveis extracelulares transitórios e excessivos de DA e glutamato no estriado, após a administração de L-DOPA (PICCONI et al., 2003; MEISSNER et al., 2006). A consequente acumulação de DA extracelular pode ser metabolizada pelos astrócitos, resultando em aumento dos produtos neurotóxicos e NO. Juntamente com excesso de glutamato, esses eventos poderiam favorecer o desenvolvimento de um ambiente pró-inflamatório no estriado com depleção dopaminérgica (FÄRBER; PANNASCH; KETTENMANN, 2005; DEL-BEL et al., 2016), levando à exacerbação do processo neuroinflamatório crônico. Apesar disso, os mecanismos de como a terapia com L-DOPA pode aumentar a resposta neuroinflamatória ainda precisa ser melhor investigada.

O papel do ambiente pró-inflamatório estriatal no modelo de DP, após o tratamento crônico com L-DOPA, pode ser evidenciado por alterações nas células da glia e liberação anormal de citocinas pró-inflamatórias (DEL-BEL et al., 2016; CARTA et al., 2017). Em ratos lesionados com 6-OHDA e discinéticos, é observado intensificação da ativação de micróglia e astrócitos no estriado, bem como das citocinas TNF- α e IL-1 β (BARNUM et al., 2008; OHLIN et al., 2011; BORTOLANZA et al., 2015a; MULAS et al., 2016). A estimulação inflamatória periférica com lipopolissacarídeo (LPS) também provocou aumento da intensidade de LID em ratos hemiparkinsonianos e de respostas inflamatórias centrais, mas não periféricas (MULAS et al., 2016). Da mesma maneira, administração exógena de corticosterona, um agente anti-inflamatório, reduziu o desenvolvimento e expressão de LID, assim como de níveis de citocinas pró-inflamatórias no estriado lesionado (BARNUM et al., 2008). Além disso, a diminuição de fatores inflamatórios como a enzima COX-2, astrócitos e micróglia está associada à diminuição da LID (BORTOLANZA et al., 2015a). Estes fatos apoiam a existência de uma relação entre LID e neuroinflamação. É concebível que a liberação anormal de fatores neurotóxicos pelas células da glia reativas, do estriado de animais discinéticos, possa contribuir para o desenvolvimento da LID, pela alteração da excitabilidade e prejuízo da plasticidade em sinapses corticoestriatais (CARTA et al., 2017).

Por fim, estudos sugerem a participação de componentes do sistema nitrérgico na inflamação associada à LID (BORTOLANZA et al., 2015a; MULAS et al., 2016; RAMIREZ-GARCIA et al., 2015). As células da glia são amplas fontes de NO no SNC (GHASEMI; FATEMI, 2014). No seu estado ativo, elas podem expressar iNOS, que então produzem elevados níveis de NO, sendo tóxico para neurônios em condições patológicas (BAL-PRICE; BROWN, 2001; MANDER et al., 2005). Em trabalhos realizados por nosso grupo de pesquisa foi observado que o tratamento com L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos está associado ao aumento da expressão de iNOS e sintase do óxido nítrico neuronal (nNOS) no

estriado lesionado (BORTOLANZA et al., 2015b; MULAS et al., 2016; PADOVAN-NETO et al. 2015; SOLÍS et al., 2015). A redução da LID também foi associada com diminuição da iNOS, sugerindo que o NO derivado das células da glia pode contribuir para o desenvolvimento da LID (DEL-BEL et al., 2016).

Apesar disso, ainda é desconhecido o processo pelo qual a L-DOPA pode estar influenciando o aumento da expressão das NOS, em especial a iNOS. Uma vez que a expressão de iNOS está aumentada em animais hemiparkinsonianos e discinéticos, mecanismos responsáveis pela regulação dessa enzima podem também estar envolvidos na DP e LID. A transcrição de iNOS é promovida pelo IFN- γ , por meio da via Janus cinase/transdutores de sinais e ativadores de transcrição-1 (Jak/STAT1; ANGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FRESNO, 1998; DELGADO, 2003), que resulta em aumento de NO em células da glia e em neurônios (FEINSTEIN et al., 1994; BOLAÑOS et al., 2002). A ativação da cascata pró-inflamatória IFN- γ , iNOS e NO pode ser tanto benéfica para o SNC, como pode induzir danos, dependendo da configuração ambiental em que estão inseridas as células (S MUÑOZ-FERNÁNDEZ; FRESNO, 1998).

Interferon- γ

O IFN- γ é uma citocina pró-inflamatória que possui papel central na patologia de doenças que afetam o SNC, sendo liberado principalmente por linfócitos-T e células natural killer. Ele possui efeitos imunomodulatórios, situando-se como principal ativador da micróglia. Em condições basais, o IFN- γ é geralmente indetectável no SNC. Porém, na presença de estímulos nocivos, há um aumento no tráfego de células T através da barreira hematoencefálica, que contribuem para o aumento dos níveis de IFN- γ no encéfalo (POPKO et al., 1997).

Os efeitos fisiológicos do IFN- γ são manifestados por meio da sua interação com o receptor (IFN- γ R), que está presente em muitos tipos de células como, os astrócitos e micróglia (DING et al., 2015; HASHIOKA et al., 2010). Seu receptor é um complexo heterodimérico composto por uma subunidade alfa de ligação à citocina (IFNGR1) e uma subunidade beta de transdução de sinal (IFNGR2). O IFN- γ possui alta afinidade para IFNGR1 e sua ligação inicia uma cascata de sinalização: ativação de JAK1 e JAK2 por meio de fosforilação, que por sua vez fosforilam o fator de transcrição citosólica inativa STAT1; uma vez ativado, STAT1 homodimeriza-se e é translocado para o núcleo, onde se liga aos elementos GAS (sequências ativadas por gama) em uma região promotora e permeia a

transcrição de genes associados ao IFN- γ (BACH; AGUET; SCHREIBER, 1997; RAMANA et al., 2002; Figura 6).

Figura 6. Transdução do sinal do IFN- γ em astrócitos humanos. O IFN- γ produz efeitos neuroinflamatórios no SNC por meio da sua ligação com o receptor IFNGR e consequente ativação da via JAK/STAT. IFN- γ : interferon- γ ; IFNGR: receptor de IFN- γ ; JAK: janus cinase; STAT: transdutores de sinais e ativadores de transcrição; GAS: sequência ativada por gamma. Adaptado de Hashioka et al. (2015).

Estudos sugerem que IFN- γ pode participar das respostas inflamatórias que estão envolvidas na DP. Por exemplo, níveis elevados de IFN- γ foram encontrados no plasma (MOUNT et al., 2007) e em regiões cerebrais como núcleo caudado, putâmen e SN de pacientes com DP (MOGI et al., 2007). Em modelos animais, como no caso de ratos com superexpressão de α -sinucleína (proteína encontrada em corpos de Lewy), foi encontrado aumento dos níveis de IFN- γ no líquido cefalorraquidiano (KRASHIA et al., 2019). Além disso, o tratamento crônico com MPTP em camundongos foi capaz de aumentar a concentração de IFN- γ no estriado, mas também no córtex dos animais (LUCHTMAN; SHAO; SONG, 2009), sugerindo a infiltração de linfócitos no SNC (BABA et al., 2005).

Há evidências de que o IFN- γ participe da degeneração de neurônios dopaminérgicos, pela regulação da atividade microglial (MOUNT et al., 2007; BARCIA et al., 2011). Em cultura de neurônios da SNC, a ação conjunta IFN- γ e LPS induziu ativação micrógliar (mas não de astrócitos), e consequente degeneração dopaminérgica (SHIBATA et al., 2003). Resultados semelhantes foram encontrados em macacos tratados com MPTP, apresentando

altos níveis de IFN- γ na SNc e de ativação da micróglia, correlacionados com morte de neurônios dopaminérgicos (BARCIA et al., 2011). Além disso, o fator de transformação do crescimento beta-1 (TGF β -1) foi capaz de impedir a ativação de micróglia induzida pelo IFN- γ , podendo prevenir a degeneração dos neurônios da via nigroestriatal (ZHOU et al., 2015).

Estudos demonstraram que o déficit na produção de IFN- γ poderia ter efeitos neuroprotetores. Em camundongos IFN- γ /KO, após injeção de MPTP, foi observada atenuação da morte de neurônios da SNc, de fibras dopaminérgicas e DAT no estriado, além de prevenção da redução de níveis DA e DOPAC estriatal e consequente inibição da microgliose, em comparação com animais WT (MOUNT et al., 2007). Outro estudo (MANGANO et al., 2012) também demonstrou em animais IFN- γ /KO efeito neuroprotetor para neurônios da SNc e terminais dopaminérgicos do estriado, após exposição do pesticida paraquat (um potente indutor de estresse oxidativo). Além disso, estes autores encontraram a prevenção da ativação da micróglia, de fatores de transcrição e de iNOS e COX-2, sugerindo que IFN- γ tem papel crucial na regulação de processos degenerativos regulados por micróglia, agindo por meio de STAT1, do fator nuclear kappa-B (NF- κ B) e da quinase p38 nesse processo (MANGANO et al., 2012). Ainda, os animais IFN- γ /KO foram protegidos de prejuízos motores e da redução dos níveis estriatais de DA, após exposição ao paraquat (LITTELJOHN et al., 2009a).

Foi demonstrado acima que a deleção do gene do IFN- γ possui papel neuroprotetor para a indução da lesão de neurônios dopaminérgicos. Contudo, não foram encontrados estudos analisando o papel do IFN- γ na lesão induzida por 6-OHDA ou mesmo no desenvolvimento da LID. Sabendo-se que (i) há um aumento na expressão de iNOS no estriado lesionado de animais parkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA; (ii) a transcrição da iNOS ocorre pela participação do IFN- γ ; (iii) há aumento da expressão das células da glia no SNC de pacientes parkinsonianos, nos modelos animais de DP e na LID, hipotetizamos que o aumento induzido da expressão de iNOS em animais com LID seja mediado pelo IFN- γ . Dessa forma, a L-DOPA estaria aumentando a produção de IFN- γ que consequentemente estimularia a expressão de iNOS.

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi investigar se a deficiência de IFN- γ interfere com a degeneração de neurônios dopaminérgicos promovida pela neurotoxina 6-OHDA, um modelo clássico da doença de Parkinson. Nos animais parkinsonianos foi analisado se a ausência da citocina influenciaria o desenvolvimento da discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA e na expressão de marcadores de neuroinflamação.

Objetivo específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- 1- Avaliar em animais WT, a presença de IFN- γ no estriado e no soro após 1, 3, 7 e 21 dias da microinjeção de 6-OHDA;
- 2- Examinar em animais WT e IFN- γ /KO, a suscetibilidade à lesão de neurônios dopaminérgicos por 6-OHDA, por meio:
 - (i) do teste do campo aberto, que avalia atividade locomotora espontânea, antes e após lesão;
 - (ii) do teste do cilindro, que mede a assimetria no uso do membro anterior;
 - (iii) da imunorreatividade da enzima TH no estriado e na SNc após 1, 3, 7 e 21 dias da microinjeção de 6-OHDA;
- 3- Investigar em animais WT e IFN- γ /KO hemiparkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA, o desenvolvimento de LID e da expressão de mediadores inflamatórios por meio da:
 - (i) avaliação do desenvolvimento de AIMs e giros contralaterais à lesão, durante 21 dias do tratamento crônico com L-DOPA;
 - (ii) análise da expressão da proteína FosB, da enzima iNOS, de micróglia e astrócitos no estriado lesionado. A micróglia e os astrócitos foram avaliados quanto a modificações na sua morfologia.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Materiais utilizados

Consumíveis comprados

Tabela 1: Lista de consumíveis comprados para a realização dos experimentos.

Tipo	Fabricante
Agulha descartável 30G	BD PrecisionGlide
Lamínula	Knittel Glass
Lâminas	Knittel Glass
Luvas	Supermax
Pipeta Pasteur	RBR
Placa 96 poços	Costar
Ponteiras 10ul, 200ul, 1000ul, 5ml e 10ml	Axygen
Seringa descartável	BD Plastipak
Tubo eppendorf 200ul, 2ml, 5 e 10ml	Eppendorf
Tubo Falcon 15ml e 50ml	Greiner

Aparelhos

Tabela 2. Lista de aparelhos utilizados no decorrer dos experimentos.

Tipo	Modelo	Fabricante
Câmera filmadora	DCR SR68	Sony
Câmera de vídeo	DFC420	Leica
Centrífuga	5403	Eppendorf
Computador	Z440	HP
Criostato	CM1850	Leica
Estereotáxico	957	KOPF
Leitor de placa	Epoch 2	Bio Tek
Lavadora de placa	Elox50	Bio Tek
Microscópio	DM6 B	Leica

Tampões preparados

No decorrer dos experimentos foram preparados os seguintes tampões e soluções:

- PBS (pH 7,4)
NaCl -1,37mM
KCl- 27mM
Na₂HPO₄-100mM
KH₂PO₄-18mM
- TBS (pH 7,4)
C₄H₁₁NO₃- 99mM
NaCl- 154mM
- PB 0,2M (pH 7,4)
NaH₂PO₄H₂O -46mM
Na₂HPO₄-16mM
- Tampão A (pH 7,4 4l)
NaH₂PO₄H₂O -18,5mM
Na₂HPO₄-204,3mM
NaCl- 154mM
Triton X-100- 6ml
- Tampão citrato (pH 6,0)
C₆H₈O₇- 1,96mM
Na₃C₆H₅O₇- 9,33mM
- PFA 4% em PBS (pH 7,4)
Paraformaldeído 4 % (p/v)
- Tampão de lise (pH 8,0)
Tris-HCl- 20mM
NaCl 137mM
glicerol- 10%
- Solução de montagem
H₂Od-200ml
Gelatina A- 0,5g
PB 0,2M-200ml
Etanol -50ml
PB 0,1M- 50ml
- Solução sacarose
C₁₂H₂₂O₁₁- 30% (p/v)
PB 0,1M
- Solução anti-congelante
PB0,2M- 125ml
H₂Od- 125ml
C₁₂H₂₂O₁₁- 0,46 mM
Etilenoglicol-150ml

Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6 selvagens (WT) provenientes do Biotério Central da USP - Campus de Ribeirão Preto e camundongos machos C57BL/6 geneticamente modificados (KO) com inativação do gene que codifica a citocina IFN- γ , provenientes de um criador comercial (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine 04609, EUA) e sua linhagem mantida pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Os animais (25g) foram alojados em grupos de 10 por caixa moradia (40 X 33 X 17 cm) em ambiente com temperatura controlada ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro de 12 horas (início do período de claro às 07h00), com livre acesso a água e alimento. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNec) para cuidado e uso de animais de laboratório. Todos os procedimentos experimentais descritos foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA; protocolo nº 2017.1.369.58.4) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP-USP).

Drogas

6-Hidroxidopamina (6-OHDA; Sigma-Aldrich, EUA) na dose de 3,75 mg/ml foi diluída em 0,9% de salina contendo 0,02 % de ácido ascórbico. L-DOPA (25 mg/kg) combinada com cloridrato de benserazida (10 mg/kg; Sigma-Aldrich, EUA), um inibidor da AADC, administradas por via intraperitoneal (PAVON et al., 2006).

Lesão unilateral por 6-OHDA

A lesão da via nigroestriatal induzida pela 6-OHDA foi baseada em estudos anteriores (DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2016). Resumidamente, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg i.p.) e receberam microinjeções de 6-OHDA num volume total de 2 μ l/injeção (2 lugares de injeção; 15 μ g/animal) na região dorsolateral do estriado nas seguintes coordenadas relativas ao Bregma (PAXINOS; WATSON, 2007): anteroposterior (AP) = +0.5; latero-lateral (LL) = -2,3 e dorsoventral (DV) = -3.9 e -3.0. A 6-OHDA foi microinjetada a uma velocidade de 0,5 μ L/min e a cânula foi mantida imóvel por um tempo adicional de 5 minutos. Os camundongos foram realojados nas caixas e foram aquecidos até recuperação da anestesia. A lesão foi avaliada histologicamente ao final dos testes comportamentais por meio da imunohistoquímica para a TH, enzima precursora de DA.

Testes comportamentais

Campo aberto

O teste do campo aberto avalia a atividade locomotora espontânea dos animais (SEIBENHENER; WOOTEN, 2015). Eles foram alocados no centro de uma arena circular (120 cm de diâmetro e 25 cm de altura), onde é permitida a livre exploração do aparato durante 10 minutos. Foram avaliados os seguintes parâmetros no aparato: distância total percorrida, tempo total de imobilidade, tempo na periferia, distância percorrida na periferia, tempo no centro, distância percorrida no centro, latência para saída do centro, número de rotações e velocidade média. Os comportamentos foram filmados e analisados pelo software *Anymaze*.

Teste do cilindro

O teste do cilindro detecta deficiências motoras no uso do membro anterior contralateral à lesão dos neurônios dopaminérgicos, dessa forma ele é utilizado para confirmar a efetividade da cirurgia de microinjeção de 6-OHDA (SCHALLERT et al., 2000). Cada animal foi colocado em um cilindro transparente (10 cm de diâmetro) e foram gravados por 5 minutos. A análise dos vídeos foi feita a cego e o observador contou o número de vezes em que as patas anteriores, ipsi e contralateral ao lado da lesão, tocaram o cilindro. É esperado que o animal com lesão estabelecida apresentasse menor porcentagem de uso da pata contralateral a lesão, comparado ao lado ipsilateral.

Tratamento com L-DOPA e avaliação dos Movimentos Involuntários Anormais

A avaliação da discinesias em roedores foi baseada no estudo de Lundblad et al. (2004). Três semanas após as lesões com 6-OHDA, os animais receberam injeção intraperitoneal de L-DOPA (25 mg/kg + benserazida 10 mg/kg), uma vez ao dia por 21 dias. Animais controle receberam salina ao invés de L-DOPA. No 1º, 7º, 14º e 21º dia de tratamento, foi realizada avaliação para a presença dos movimentos involuntários anormais (AIMs), atribuindo escores para cada AIMs (Figura 7): **A) distonia axial**: flexão lateral ou rotação axial de pescoço e tronco no sentido contralateral à lesão; **B) discinesia do membro anterior**: movimentos de flexão-extensão, abdução-adução ou movimento circular do membro anterior contralateral à lesão; **C) discinesia orofacial**: movimentos contralaterais à lesão da mandíbula, protrusão da língua. Além disso, foi avaliada a rotação induzida por L-DOPA, pela

contagem do número de giros para o lado contralateral à lesão. Cada um dos AIM foi analisado durante 2 minutos, a cada 20 minutos da administração de L-DOPA, por até 120 minutos. Foram dados dois escores, de 0 a 4, para presença e para intensidade de cada AIM.

Figura 7. Categorias de AIMs em camundongos hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA. Imagens representativas dos AIMs: distonia axial, orofacial e do membro anterior contralateral à lesão após 30 minutos do uso de L-DOPA (25mg/kg). AIM: movimentos involuntários anormais. Adaptado de Sebastianutto et al. (2016).

Análise molecular

Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Neste estudo, o soro e as amostras de estriado obtidos dos diferentes grupos experimentais e avaliados quanto à presença de IFN- γ . No experimento 1, camundongos WT receberam L-DOPA e 60 minutos depois foram anestesiados, decapitados e tiveram seus encéfalos removidos para dissecação do estriado dorsolateral ipsilateral à lesão. As amostras de

estriado foram homogeneizadas em tampão de lise, complementado com inibidores de protease (10% v/v; Sigma) e fosfatase (Roche). Adicionalmente, foi coletado sangue dos animais para obtenção do soro. As amostras foram centrifugadas a 4°C (10000 rpm por 10 minutos) e imediatamente mantidas em gelo. O sobrenadante foi então recolhido e armazenado a -80°C até o momento da quantificação. Resumidamente, a detecção de IFN- γ foi realizada empregando anticorpos de captura, citocinas-padrão e anticorpos associados à biotina e amplificados com estrepto-avidina-peroxidase. Como substrato foi utilizado dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) e a reação foi bloqueada adicionando ácido sulfúrico (1M) aos poços. A equação da reta referente à curva padrão, produzida a partir de humano recombinante, foi utilizada para calcular os níveis de IFN- γ em cada amostra. Todas as amostras foram ensaiadas em duplicata. A leitura das amostras foi feita em espectrofotômetro, utilizando-se em filtro de 450nm com correção de 570nm.

Imunohistoquímica

Uma hora após a última injeção de L-DOPA, os animais foram anestesiados com tribromoetanol e receberam, por meio da artéria aorta, a infusão de 50 ml de solução salina (0,9%), seguida por um volume de 100 ml de paraformaldeído (PFA) 4%. Os encéfalos foram retirados e pós-fixados em PFA 4% por 2 horas a 4°C e crioprotetidos em solução de sacarose 30% a 4°C por 48 horas. Os encéfalos foram finalmente congelados a -40°C em isopentano e armazenados em freezer -70°C até o início do processamento histológico. Secções coronais representativas ao longo da extensão rostrocaudal do estriado e da substância negra foram processadas na espessura de 25 μ m em criostato e foram estocadas a -20° em solução anticongelante até o uso. A reação imunohistoquímica foi realizada utilizando o método *free floating* para análise da expressão de: TH (TH, 1:1000; US Biological, EUA), FosB (1: 4000; rabbit anti-FosB, Sta. Cruz, EUA), iNOS (1:400; rabbit anti-iNOS, Sta. Cruz, EUA), molécula adaptadora de ligação ao cálcio 1 (Iba-1) (marcador de micróglia, 1:1000; mouse anti-Iba-1, Abcam, UK) e proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (marcador de astrócitos 1:1000; Sigma-Aldrich, EUA). As secções foram submetidas à recuperação antigênica durante 30 minutos à 70°C em tampão citrato de sódio, e então incubadas em solução de peróxido de hidrogênio 1% para eliminar o desenvolvimento de reações inespecíficas. Após bloqueio com soro específico (5%) + BSA (2%), foi realizada incubação com anticorpos primários (*overnight*) e secundários (por 90 min), seguida de 2 horas no complexo avidina-biotina-peroxidase (Vectastain ABC Elite Kit, Vector Laboratories, CA, EUA) as secções foram reveladas com tetracloro de 3'3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma, EUA). As secções foram, então, montadas em lâminas

gelatinizadas e cobertas com lâminula para observações microscópicas. Amostras de cada grupo experimental foram processadas ao mesmo tempo.

Análise de imagens

Todas as imagens foram adquiridas em ambos os lados de cada estrutura (ipsi- e contralateral). As configurações de câmera e luz foram otimizadas para evitar saturação do sinal e mantidas constantes até o final das análises. As imagens da reação foram capturadas para TH, FosB e iNOS em um aumento de 20X e para as células da glia (GFAP e Iba-1) em um aumento de 40X, por uma câmera de vídeo acoplada a microscópio de luz e transmitidas a um computador equipado com um programa de análise de imagens (Leica Application Suite, versão 3.0.4) para ajustes de luz e cores. Uma vez digitalizadas, as análises foram realizadas utilizando o programa Fiji ImageJ. O estriado e SNc foram divididos em 3 níveis de secções: rostral, medial e caudal. As secções de estriado, ainda, foram divididas em quadrantes (dorsomedial, dorsolateral e ventrolateral; Figura 8).

Figura 8. Regiões e áreas analisadas do estriado e SNc de camundongos. Representação ilustrativa do bregma das secções para análise de estriado e SNc rostral, medial e caudal. Dentro de cada secção, o estriado foi subdividido em quadrantes. Secções rostrais e mediais divididas em: dorsomedial (DM), dorsolateral (DL) e ventrolateral (VL); secções caudais divididas em: DL e VL. Adaptado de Franklin e Paxinos (2008).

Para a análise da expressão de TH, o estriado e SNc foram avaliados por densidade óptica integrada, subtraindo-se o valor de densidade de áreas não imunorreativas. Os dados estão apresentados como porcentagem da imunorreatividade para TH, quantificado no lado ipsilateral, em relação ao lado contralateral não lesionado correspondente (considerado 100%).

Para a análise da expressão de FosB e iNOS no estriado, o número de células positivamente marcadas foram contadas automaticamente por configurações no *software*. Os resultados foram avaliados pelo experimentador, que excluiu marcações inespecíficas a fim de que somente os núcleos corretos fossem contados.

Quantificação da Micróglia e Astrócitos

Para micróglia e astrócitos, foi analisada a região dorsolateral do estriado (MULAS et al., 2016). Foi quantificado o número de células, além de realizada análise das modificações da morfologia por meio do *plugin* “*Analyze Skeleton*” do Fiji ImageJ, que marca todos os pixels em uma imagem de esqueleto e conta todas as suas junções/intersecções, pontos de extremidade, ramificações, além de medir o comprimento das ramificações.

O protocolo de análise da morfologia da micróglia foi adaptado de Young e Morrisson (2018). Resumidamente, as imagens foram transformadas em escalas de cinza (8-bit) e ruídos do *background* foram eliminados pelas funções *Despeckle* e *Remove outliers*. As imagens foram convertidas para binárias e então transformadas para *skeleton* usando a função *Skeletonize* (2D/3D). Finalmente, os esqueletos resultantes foram analisados por meio do *plugin Analyze Skeleton* (2D/3D) para contagem dos pontos de extremidade (*endpoints*) e comprimento das ramificações (μm) por célula (Figura 9). Os resultados foram expressos em números por mm^2 ou comprimento (μm) por mm^2 .

Figura 9. Protocolo de análise morfológica de micróglia. Ilustração dos processos utilizados no Fiji ImageJ para a análise da morfologia de micróglia expressas no estriado de animais hemiparkinsonianos após o tratamento com L-DOPA. Da direita para esquerda: (A) das imagens capturadas no aumento de 40X, (B) foi removido ruídos de fundo, (C) transformadas em binárias e (D) então em esqueleto. Foi analisado o comprimento das ramificações e o número de endpoints/por número de células.

A análise morfológica dos astrócitos foi baseada no descrito por Giocanti-Auregan et al. (2016). Resumidamente, as imagens foram transformadas em escalas de cinza (8-bit) e o

ruído removido pelo plugin *Smooth* (3D). As imagens foram transformadas em binárias e, então, em *skeletons* usando a função *Skeletonize* (2D/3D). Finalmente, os esqueletos resultantes foram analisados por meio do *plugin Analyze Skeleton* (2D/3D), onde foram somados o número de ramificações (processos de astrócitos), número de intersecções e a média do comprimento dos ramificações (Figura 10). Os resultados foram expressos em números por mm^2 ou comprimento (μm) por mm^2 .

Figura 10. Protocolo de análise morfológica de astrócitos. Ilustração dos processos utilizados no Fiji ImageJ para a análise da morfologia de astrócitos expressos no estriado de animais hemiparkinsonianos após o tratamento com L-DOPA. Da direita para esquerda: (A) das imagens capturadas no aumento de 40X, (B) foi removido ruídos de fundo, (C) transformadas em binárias e (D) então em esqueleto. Foi então analisado a ramificação e as intersecções/ mm^2 apresentadas pelos astrócitos.

Delineamento experimental

Este estudo foi dividido dois experimentos detalhados a seguir:

Experimento 1: Análise da interferência do IFN- γ na lesão unilateral por 6-OHDA.

No experimento 1 (esquematizado na Figura 11), foi realizada cirurgia para microinjeção unilateral no estriado lateral de 6-OHDA de animais WT e IFN- γ /KO (dia 0). Os animais foram sacrificados 1, 3, 7 ou 21 dias após a cirurgia (n=3-7 por grupo). Para análise da extensão da lesão, foi investigada a expressão de TH no estriado e SNc de todos os animais. Adicionalmente, foram analisados os níveis de IFN- γ no estriado e soro em animais WT.

Figura 11. Linha temporal representativa do experimento 1: time-course da lesão com 6-OHDA. Animais WT e IFN- γ /KO receberam 6-OHDA e foram sacrificados após 1, 3, 7, e 21 dias da cirurgia para análise dos níveis de IFN- γ (apenas em animais WT) e da degeneração dos neurônios e terminais dopaminérgicos. n=3-7 por grupo.

Experimento 2: Análise da ausência IFN- γ sobre a indução da discinesia pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de iNOS e células da glia em animais hemiparkinsonianos

No experimento 2 (esquematizado na Figura 12), animais WT e IFN- γ KO foram lesionados com 6-OHDA e após 21 dias foram avaliados quanto a intensidade da lesão por meio do teste do cilindro. O teste do campo aberto foi realizado antes e após 21 dias da cirurgia. Foi iniciado tratamento com L-DOPA ou salina por 21 dias e os escores de discinesia avaliados no 1º, 7º, 14º e 21º dia de tratamento. Os animais foram sacrificados para análise imunohistoquímica (n=5-7 por grupo). A lesão foi confirmada pela análise da marcação para TH no estriado e SNc. A expressão de FosB, iNOS, micróglia e astrócitos foi investigada no estriado.

Figura 12. Linha temporal representativa do procedimento geral do experimento 2. Camundongos foram lesionados unilateralmente com 6-OHDA e 21 dias após a microinjeção, passaram por testes comportamentais (teste do cilindro e campo aberto). Foi iniciado o tratamento com L-DOPA por 21 dias e avaliado os níveis de discinesia no 1º, 7º, 14º e 21º dia de tratamento. Os animais foram sacrificados no 22º dia para análises moleculares.

Análise estatística

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi realizada utilizando o *software Prism7*. Para análise de dois grupos, foi utilizado teste t de *Student*. Para mais de dois grupos e apenas uma variável independente, foi utilizada ANOVA de uma via. Para mais de dois grupos e duas variáveis independentes foi utilizada ANOVA de duas vias. Os testes de ANOVA foram seguidos por teste de comparações múltiplas apropriados. Para análise de correlação foi utilizado o teste de correlações de Pearson. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A análise estatística correspondente a cada experimento está descrita na legenda figura. Na análise semiquantitativa das reações imunohistoquímicas, quando não havia diferenças entre os quadrantes do estriado ou em sua extensão rostrocaudal, foi realizada média dos resultados obtidos.

RESULTADOS

RESULTADOS

Experimento 1: Análise da interferência de IFN- γ na lesão unilateral por 6-OHDA

Análise da lesão de neurônios dopaminérgicos por meio da avaliação da imunorreatividade para TH no estriado e SNc

Animais IFN- γ /KO e WT foram microinjetados com 6-OHDA e sacrificados para análise imunohistoquímica para a enzima TH no estriado e na SNc após 1, 3, 7 e 21 dias da indução da lesão (Figura 13).

Entre os dias após microinjeção foi encontrada diferença na lesão dos terminais dopaminérgicos do estriado rostral (Figura 13A; *lesão vs tempo de sacrifício* $F(3, 33) = 44,53$; $p < 0,01$). Nos dois grupos de animais (WT e IFN- γ /KO), a densidade ótica medida para a expressão da enzima TH, no dia 1 após cirurgia, mostrou diminuição das fibras dopaminérgicas em torno de 27%; no dia 3, uma diminuição de aproximadamente 73%; nos dias 7 e 21 a redução atingiu até 83%. No estriado medial, houve diferença na lesão entre os dias de sacrifício (Figura 13B; *lesão vs tempo de sacrifício* $F(3, 33) = 83,31$; $p < 0,01$). No primeiro dia após a cirurgia houve redução de cerca de 33% na densidade ótica para a imunorreatividade da enzima TH; no 3º dia aproximadamente 76%, no 7º dia em torno de 83%, e chegou a até 87% ao 21º dia. No estriado rostral e medial não houve diferença no desenvolvimento da lesão entre os grupos WT e IFN- γ /KO (*lesão vs genótipo* $p > 0,05$). No estriado caudal foi encontrada diferença na lesão entre os grupos WT e IFN- γ /KO somente no 1º dia após a cirurgia (Figura 13C; *lesão vs genótipo* $F(1, 33) = 9,116$; $p < 0,01$). O grupo WT apresentou redução de aproximadamente 33% da imunomarcacão para TH e o grupo IFN- γ /KO de cerca de 12%. Para ambos os grupos experimentais, houve diferença entre os dias após a lesão (*lesão vs tempo de sacrifício*, $F(3, 33) = 83,31$; $p < 0,01$), no dia 3 após microinjeção houve diminuição da expressão de TH de cerca de entre 78%, no dia 7 em torno de 85% e no 21º dia de até 87%, em todo o estriado. A lesão que ocorreu no primeiro dia após a microinjeção estava concentrada na região dorsal e se estendeu para todo estriado nos demais dias.

Em toda extensão rostrocaudal da SNc, a progressão da lesão aconteceu de forma semelhante entre os animais WT e IFN- γ /KO (*lesão vs genótipo* $p > 0,05$). No nível rostral da SNc, entre os dias após a microinjeção de 6-OHDA houve diferença na intensidade da morte de neurônios dopaminérgicos (Figura 13D; *lesão vs tempo de sacrifício* $F(3, 34) = 7,212$; $p < 0,01$). A densidade ótica medida para a imunomarcacão de TH indicou redução de cerca de 38% de neurônios dopaminérgicos no 1º e 3º dia após lesão. No 7º dia houve redução de

aproximadamente 55% e no 21º dia de até 90%. Na SNc medial, entre os dias após a microinjeção de 6-OHDA houve diferença na intensidade da lesão (Figura 13E; *lesão vs tempo de sacrifício* $F(3, 34) = 10,64$; $p < 0,01$). Foi observado redução da imunomarcagem para TH de cerca de 36% no 1º dia após microinjeção de 6-OHDA, aproximadamente 45% no 3º dia, em torno de 62% no 7º dia e de até 83% no 21º dia. Na SNc caudal, houve diferença na redução de neurônios TH⁺ entre os dias após a lesão (Figura 13F; *lesão vs tempo de sacrifício* $F(3, 33) = 9,791$; $p < 0,01$). Foi observada diminuição da expressão de TH de aproximadamente 27% no 1º dia após microinjeção, de cerca de 33% no 3º dia, em torno de 51% no 7º dia e de até 75% no 21º dia.

Figura 13. Avaliação da porcentagem de imunorreatividade para TH no estriado e na SNc após injeção de 6-OHDA no decorrer de 21 dias. Avaliação por densidade ótica. Há diferença de lesão entre animais WT e IFN- γ /KO apenas no 1º dia do nível caudal do estriado. Níveis rostral (A), medial (B) e caudal (C) do estriado. Níveis rostral (D), medial (E) e caudal (F) da SNc. * $p < 0,01$ em comparação com o respectivo grupo WT; + $p < 0,01$ em comparação ao grupo 1 dia; # $p < 0,05$ em comparação ao grupo 3 dias. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 3-7$.

Figura 14. Fotomicrografias representativas da lesão dopaminérgica por 6-OHDA no estriado. Em animais WT e IFN- γ /KO, é possível observar a progressiva perda fibras TH⁺ no estriado ao longo os dias após a microinjeção de 6-OHDA. Bregma +0,86. Aumento de 2,5x.

Figura 15. Fotomicrografias representativas da lesão dopaminérgica por 6-OHDA na SNc. Em animais WT e IFN- γ /KO, é possível observar a progressiva perda de neurônios TH⁺ na SNc ao longo dos dias após a microinjeção de 6-OHDA. Bregma -3,16. Aumento de 5x.

Análise da presença de IFN- γ no soro e estriado de animais WT após lesão

A concentração de IFN- γ foi avaliada utilizando-se imunoensaio (ELISA) no soro e estriado dos animais WT, 1 dia, 3 dias, 7 dias e 21 dias após a microinjeção de 6-OHDA. A análise de IFN- γ no soro dos animais mostrou níveis baixos do limite de detecção do imunoensaio. A concentração de IFN- γ não foi detectada no lado contralateral à lesão (controle), em nenhum dos grupos de animais. No estriado lesionado foi observado aumento dos níveis de IFN- γ em todos os tempos analisados, em comparação com o estriado não lesionado (*concentração x tempo de sacrifício* $F(4, 27) = 39,34$; $p < 0,01$). Não houve diferença na concentração do IFN- γ entre os dias 1, 3, 7 e 21, sugerindo que a progressão da lesão dos neurônios dopaminérgicos não foi acompanhada por modificação nos níveis de IFN- γ (Figura 16). A concentração de IFN- γ medida ficou abaixo do primeiro ponto da curva padrão (31,25 pg/ml).

Figura 16. Análise temporal dos níveis de IFN- γ após a microinjeção de 6-OHDA. Em animais WT, foi realizada no estriado medida de IFN- γ , 1, 3, 7, e, 21 dias após a cirurgia de lesão dopaminérgica. Em comparação ao lado contralateral, foi encontrado aumento dos níveis da citocina após a indução de lesão. Não houve diferença entre os grupos de estriado lesionados. ANOVA de uma via. * $p < 0,01$ em comparação ao lado não lesionado. $n=4-8$.

Experimento 2: Análise da ausência de IFN- γ sobre a indução da discinesia pelo tratamento com L-DOPA e na expressão de iNOS e de células da glia em animais hemiparkinsonianos

Avaliação do teste do Campo Aberto

No dia anterior à cirurgia para microinjeção de 6-OHDA e após 21 dias, os animais WT e IFN- γ /KO foram analisados no teste do Campo Aberto. Foi avaliada distância total percorrida, latência para sair do centro, tempo total de imobilidade, número de rotações e velocidade média (Tabela 3).

Antes da lesão, os animais IFN- γ /KO, quando comparados com o grupo WT, (i) percorreram em torno de 36% menos o aparato ($F(1, 37) = 25,77$; $p < 0,05$); (ii) apresentaram número de rotações cerca de 32% menor ($F(1, 37) = 29,02$; $p < 0,05$); (iii) exibiram velocidade média aproximadamente 37% inferior ($F(1, 37) = 48,23$; $p < 0,05$) e (iv) apresentaram aumento no tempo total de imobilidade por volta de 135% ($F(1, 37) = 65,43$; $p < 0,05$). Os valores mensurados de latência para saída do centro foram semelhantes entre os grupos de animais ($p > 0,05$).

A lesão da via nigroestriatal afetou os animais WT e IFN- γ /KO de forma semelhante ($p > 0,05$). Após a lesão, foi observado em ambos os grupos de animais: (i) diminuição em torno de 65% da distância percorrida ($F(1, 37) = 141,1$; $p < 0,05$); (ii) redução em torno de 35% do número de rotações ($F(1, 37) = 22,14$; $p < 0,05$) e (iii) aumento de cerca de 87% no tempo de imobilidade ($F(1, 37) = 41,35$; $p < 0,05$). O valor de velocidade média e da latência para saída do centro não foram afetados pela lesão ($p > 0,05$).

Tabela 3. Avaliação atividade locomotora espontânea no Campo Aberto após lesão com 6-OHDA em animais WT e IFN- γ /KO

	<i>Antes da lesão</i>		<i>Após a lesão</i>	
	WT	IFN- γ /KO	WT	IFN- γ /KO
Distância total percorrida (m)	23,8 $\pm$ 0,9	15,3 $\pm$ 0,9*	8,2 $\pm$ 0,8 [#]	5,5 $\pm$ 0,4 [#]
Latência para saída do centro (s)	5,8 $\pm$ 0,8	6,4 $\pm$ 0,9	4 $\pm$ 0,8	8,7 $\pm$ 1,6 ^{&}
Tempo total de imobilidade (s)	70 $\pm$ 9,1	165,1 $\pm$ 6,1*	140,4 $\pm$ 10,6 [#]	286,6 $\pm$ 0,9 [#]
Número de rotações	33,6 $\pm$ 1,3	22,9 $\pm$ 1,4*	24,3 $\pm$ 2,4 [#]	13 $\pm$ 0,7 [#]
Velocidade média (m/s)	0,04 $\pm$ 0,001	0,025 $\pm$ 0,001*	0,04 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,001

Valores apresentados na forma de Média $\pm$ EPM. * $p < 0,01$ em comparação ao respectivo o grupo WT. [#] $p < 0,01$ em comparação ao respectivo grupo antes da lesão. [&] $p < 0,1$ em comparação ao respectivo grupo WT. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. n=8-12 por grupo.

Avaliação da lesão dopaminérgica pelo teste do cilindro

Como forma de verificar a intensidade da perda dopaminérgica foi utilizado o teste do cilindro. Em animais lesionados, foi encontrado que o uso do membro contralateral à lesão (esquerdo), foi em torno de 75% inferior ao membro direito, indicando prejuízo motor no lado contralateral à lesão (Figura 17; *lado direito vs lado esquerdo* $F(1, 38) = 445,4$; $p < 0,01$). A intensidade da lesão dos animais IFN- γ /KO e WT foi semelhante ($p > 0,05$).

Figura 17. Avaliação do uso dos membros anteriores após microinjeção de 6-OHDA. Os animais WT e IFN- γ /KO foram lesionados e após 21 dias apresentaram diminuição significativa no uso do membro esquerdo (contralateral à lesão) em relação ao direito. * $p < 0,01$ vs membro direito. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 10-11$ por grupo.

Análise da discinesia induzida por L-DOPA em animais parkinsonianos WT e IFN- γ /KO

Decorridos 21 dias da cirurgia, os animais parkinsonianos receberam L-DOPA (25mg/kg) por 21 dias. Os animais selecionados para o tratamento farmacológico apresentaram, segundo o teste do cilindro, lesão dopaminérgica semelhante. A discinesia induzida por L-DOPA foi avaliada no 1º, 7º 14º e 21º dia de tratamento utilizando-se a escala descrita por Lundblad et al. (2004) e Pavón et al. (2006).

A administração de L-DOPA nos animais parkinsonianos induziu AIMs da musculatura axial, do membro anterior e orofacial. A administração de salina nos animais hemiparkinsonianos não produziu discinesia.

Apresentamos na Figura 18A a somatória destes valores (ALO AIMs) induzida pelo tratamento com L-DOPA nos animais parkinsonianos. Entre os dias de tratamento com L-

DOPA não houve diferença nos escores de discinesia avaliada nos animais WT e IFN- γ /KO (*intensidade de discinesia x tempo* $p>0,05$). Adicionalmente, os escores de discinesia dos animais IFN- γ /KO não apresentaram diferença, quando comparados aos escores dos animais WT, em todos os tempos analisados (*intensidade de discinesia x genótipo* $p>0,05$).

O tratamento com L-DOPA induziu alterações na rotação dos animais (Figura 18B). A partir do 7º dia de administração de L-DOPA, é possível notar que houve aumento do número de rotações dos animais IFN- γ /KO, o qual não alcançou diferença estatística (*número de giros vs genótipo* $p>0,05$).

A Figura 18C-E detalha a quantificação de cada tipo de discinesia separadamente. Para os escores de discinesia do membro anterior, não foram encontradas diferenças significativas entre os escores dos animais WT e IFN- γ /KO (Figura 18C; *intensidade de discinesia x genótipo* $p>0,05$). Da mesma forma para discinesia orofacial, desde o primeiro dia do tratamento é possível observar escores semelhantes em ambos os grupos de animais (Figura 18D; *intensidade de discinesia x genótipo* $p>0,05$). Não houve diferenças entre os escores dos animais WT e IFN- γ /KO na distonia axial (Figura 18E; *intensidade de discinesia x genótipo* $p>0,05$), embora seja possível notar que os escores do grupo IFN- γ /KO sejam ligeiramente maiores em comparação aos do grupo WT.

Figura 18. Avaliação temporal das discinesias. Em animais hemiparkinsonianos, foram avaliados escores de discinesia e o número de giros contralaterais à lesão no 1º, 7º, 14º e 21º dia de tratamento com L-DOPA. Não houve diferenças significativas entre os animais WT e IFN- γ /KO. (A) Somatório das discinesias: orofacial, do membro anterior e distonia axial; (B) Somatório da rotação contralateral à lesão; (C) discinesia do membro anterior; (D) discinesia orofacial; (E) discinesia axial. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. n=5-7 por grupo.

A administração de L-DOPA provocou manifestação de AIMS já nos primeiros 20 minutos após a sua injeção em ambos os grupos WT e IFN- γ /KO (Figura 19). Tanto no 1º dia, como no 21º dia de tratamento, os escores de discinesia permaneceram constantes até por volta dos 80 minutos após tratamento. Observou-se um declínio gradativo até a última quantificação, aos 120 minutos (Figura 19 A e B). Apesar de inferior, os escores de discinesia dos animais IFN- γ /KO não foram diferentes dos animais WT no 1º dia (Figura 19A; *intensidade de discinesia x genótipo* $p > 0,05$) e no 21º dia de tratamento com L-DOPA (Figura 19B; *intensidade de discinesia x genótipo* $p > 0,05$). Não foram encontradas diferenças na rotação no 1º dia (Figura 19C; *número de giros vs genótipo* $p > 0,05$) e no 21º de tratamento com L-DOPA (Figura 19D; *número de giros vs genótipo* $p > 0,05$).

Figura 19. Curva temporal de avaliação de discinesia em um dia de tratamento. Os escores de discinesia e rotação contralateral à lesão são avaliados a cada 20 minutos por até 2 horas da injeção de L-DOPA nos animais WT e IFN- γ /KO. Não houve diferença entre os grupos de animais. (A) Somatória das discinesias: orofacial, do membro anterior e distonia axial no 1º dia de administração de L-DOPA. (B) Somatória das discinesias no 21º dia de administração de L-DOPA. (C) Somatória da rotação no 1º dia de administração de L-DOPA. (D) Somatória da rotação no 21º dia de administração de L-DOPA. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. n=5-7 por grupo.

Confirmação da lesão por 6-OHDA pela análise da imunorreatividade para TH no estriado e na SNc

Os animais foram sacrificados 40 minutos após a última injeção de L-DOPA. A análise imunohistoquímica para a enzima TH confirmou a indução de lesão pela neurotoxina 6-OHDA nos terminais dopaminérgicos do estriado e nos corpos de neurônios da SNc, no hemisfério ipsilateral à lesão. A extensão da lesão foi avaliada nos níveis rostral, medial e caudal do estriado e da SNc (Figuras 21 e 22).

A densidade ótica da imunomarcagem para a enzima TH revelou diminuição dos terminais dopaminérgicos no estriado lesionado, em relação ao hemisfério intacto, nos níveis rostral (Figura 20A; $F(4, 21) = 148,1$; $p < 0,01$), medial (Figura 20B; $F(4, 20) = 854,1$; $p < 0,01$) e caudal (Figura 20C; $F(4, 24) = 478,8$; $p < 0,01$). Os animais WT e IFN- γ /KO apresentaram lesão semelhante no estriado microinjetado com 6-OHDA ($p > 0,05$), onde houve redução média de 95% na imunorreatividade para TH.

A densidade ótica na SNc lesionada, em comparação ao lado contralateral à lesão, apresentou diminuição nos níveis rostral (Figura 20D; $F(4, 22) = 127,5$; $p < 0,01$), medial (Figura 20E; $F(4, 22) = 325,8$; $p < 0,01$) e caudal (Figura 20F; $F(4, 20) = 755,3$; $p < 0,01$). Os animais WT e IFN- γ /KO apresentaram lesão semelhante na SNc ipsilateral à lesão ($p > 0,05$), onde houve redução média de 85% na imunorreatividade para TH.

Figura 20. Avaliação da lesão por 6-OHDA no estriado e SNc. Em animais WT e IFN- γ /KO foi avaliada a porcentagem de imunorreatividade para enzima TH no estriado e na SNc, indicando depleção dopaminérgica no hemisfério lesionado com 6-OHDA. Não houveram diferenças entre os grupos WT e IFN- γ /KO. Quantificação por densidade ótica. Níveis rostral (A), medial (B) e caudal (C) do estriado. Níveis rostral (D), medial (E) e caudal (F) da SNc. * $p < 0,01$ em comparação com o hemisfério sem lesão. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 5-7$ por grupo.

Figura 21. Fotomicrografias representativas da perda de fibras TH+ no estriado. Imagens da imunomarcção de TH ao longo da extensão rostrocaudal do estriado microinjetado com 6-OHDA, de animais WT e IFN- γ /KO tratados com salina ou L-DOPA. Bregmas: Rostral +0,86; Medial +0,14; Caudal -0,34. Aumento de 1,25x.

Figura 22. Fotomicrografias representativas da perda de neurônios TH+ na SNc. Imagens da imunomarcção de TH ao longo da extensão rostrocaudal da SNc, após microinjeção estriatal de 6-OHDA, de animais WT e IFN- γ /KO tratados com salina ou L-DOPA. Bregmas: Rostral +0,86; Medial +0,14; Caudal -0,34. Aumento de 1,25x.

Expressão de neurônios TH+ no estriado lesionado dos animais parkinsonianos e discinéticos

No estriado lesionado com 6-OHDA de animais que receberam tratamento com L-DOPA, são observados corpos celulares neuronais TH⁺ onde ocorreu robusta redução dos terminais dopaminérgicos (BUSCETI et al., 2012; ESPADAS et al., 2012; Figura 23). Tais neurônios não são observados nos animais lesionados que receberam salina.

Nossos resultados indicam que o tratamento com L-DOPA induziu aumento no número dos neurônios TH⁺ no estriado lesionado de animais IFN- γ /KO (64% no nível rostral e 47% no nível medial, $p < 0,05$, Figura 23B), quando comparados ao estriado lesionado dos

animais WT (Figura 23A). No nível caudal a diferença não atingiu significância estatística ($p>0,05$).

Figura 23. Fotomicrografias de neurônios imunorreativos para TH no estriado lesionado após o tratamento com L-DOPA. Há aumento do número de tais neurônios em animais IFN- γ /KO. Células TH⁺ no estriado medial (Bregma + 0,14mm) ipsilateral à lesão de animais hemiparkinsonianos WT (A) e IFN- γ /KO (B) tratados cronicamente com L-DOPA por 21 dias. A e B: aumento de 1,25x; A' e B': aumento de 20x. Quantificação do número de neurônios TH⁺ no estriado ipsilateral à lesão. (C) Nível rostral; (D) Nível medial; (E) Nível caudal. * $p<0,05$ em comparação ao grupo WT. Teste t de Student. n=5 por grupo.

Avaliação da expressão de FosB no estriado

No estriado lesionado de animais WT e IFN- γ /KO tratados com L-DOPA, foi analisada a expressão da proteína FosB, que é correlacionada ao aparecimento de discinesia (PAVÓN et al., 2006; Figura 24). No estriado lesionado em ambos os grupos WT e IFN- γ /KO, o tratamento com L-DOPA induziu aumento na expressão da proteína nos níveis rostral (Figura 24A; F (3, 16) = 19,22; p<0,01), medial (Figura 24B; F (3, 15) = 22,1; p<0,01) e caudal (Figura 24C; F (3, 16) = 20,97; p<0,01). O aumento da expressão de FosB foi semelhante entre os grupos WT e IFN- γ /KO (p>0,05). O estriado não lesionado apresentou pouca ou nenhuma expressão de FosB (dados não apresentados).

Figura 24. Análise da expressão de FosB no estriado lesionado em animais parkinsonianos. Em animais WT e IFN- γ /KO que receberam L-DOPA por 21 dias foi encontrado aumento no número de células FosB+ no estriado ipsilateral à lesão. Não houve diferenças entre os grupos WT e IFN- γ /KO. (A) Representação da expressão de FosB no estriado. Aumento de 20x. Quantificação nos níveis (B) rostral, (C) medial e (D) caudal do estriado. *p<0,01 comparado ao respectivo grupo salina. ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. n=4-5 por grupo. c.c.: corpo caloso.

Avaliação da expressão de iNOS no estriado

A expressão da enzima iNOS foi avaliada na extensão rostrocaudal de ambos estriados lesionado e não lesionado, nos animais WT e IFN- γ /KO, após o tratamento com L-DOPA (Figura 25).

Nos níveis rostral e medial, foi observado aumento da expressão de iNOS no estriado lesionado dos animais IFN- γ /KO/L-DOPA, quando comparado aos animais IFN- γ /KO tratados com salina (cerca de 54% no nível rostral e 34% no medial); a expressão de iNOS no estriado dos animais IFN- γ /KO/L-DOPA foi superior àquela observada nos animais WT/L-DOPA (cerca de 45% no nível rostral e 28% no medial) (Rostral: Figura 25A; $F(3, 36) = 12,93$; $p < 0,01$; Medial: Figura 25B; $F(3, 34) = 5,218$; $p < 0,01$).

No nível caudal do estriado lesionado, foi observado aumento em torno de 50% da expressão de iNOS no grupo IFN- γ /KO/L-DOPA, quando comparado ao grupo WT/L-DOPA (Figura 25C; $F(3, 33) = 4,97$; $p < 0,01$).

A expressão de iNOS no estriado lesionado de todos os grupos de animais, foi maior que aquela exibida no estriado não lesionado (Rostral: $F(1, 36) = 30,25$; $p < 0,01$; Medial: $F(1, 34) = 58,16$; $p < 0,01$; Caudal: $F(1, 33) = 24,91$; $p < 0,01$).

Figura 25. Análise da expressão de iNOS no estriado em animais parkinsonianos e discinéticos.

Houve aumento da iNOS em animais IFN- γ /KO/L-DOPA. (A) Representação da expressão de iNOS no estriado. Aumento de 20x. Quantificação nos níveis (A) rostral, (B) medial e (C) caudal do estriado * $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo WT. # $p < 0,01$ comparado ao respectivo grupo salina. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. $n = 4-6$ por grupo. Sal: Salina. LD: L-DOPA. c.c.: corpo caloso.

Avaliação da expressão de Iba-1

Na extensão rostrocaudal da região dorsolateral do estriado, foi avaliada a expressão de Iba-1, marcador de células microgliais (Figura 27). No estriado dorsolateral lesionado dos animais IFN- γ /KO/L-DOPA foi observado aumento de aproximadamente 22% no número de micróglia, em comparação ao grupo WT/L-DOPA (Figura 26A; $F(3, 41) = 8,204$; $p < 0,05$). Em todos os animais, foi observado aumento do número de micróglia no estriado dorsolateral lesionado, em comparação ao lado não lesionado ($F(1, 41) = 148,1$; $p < 0,01$).

Foi ainda quantificado o comprimento dos prolongamentos e o número de pontos de terminação das ramificações (*endpoints*) por célula (YOUNG; MORRISON, 2018), como indicação do processo de ativação da micróglia. A análise morfológica da micróglia indicou que os animais IFN- γ /KO/L-DOPA apresentaram tendência à redução do número de *endpoints*/célula ($p = 0,06$), em comparação ao grupo WT/L-DOPA. Comparado ao estriado não lesionado, todos os animais apresentaram diminuição do número de *endpoints* no estriado ipsilateral à lesão (Figura 26B; $F(1, 42) = 53$; $p < 0,01$).

O grupo IFN- γ /KO/L-DOPA apresentou redução do comprimento dos prolongamentos de cerca de 23%, em comparação ao grupo WT/L-DOPA, e de aproximadamente 32% comparado ao grupo IFN- γ /KO salina (Figura 26C; $F(3, 39) = 3,03$; $p < 0,05$). Comparado ao lado não lesionado, foi observado diminuição no comprimento das ramificações da micróglia do estriado dorsolateral lesionado de todos os animais ($F(1, 39) = 46,49$; $p < 0,01$).

Figura 26. Análise da morfologia da micrógliia no estriado lesionado e não lesionado após tratamento crônico com L-DOPA. O estriado dorsolateral lesionado apresentou aumento de micrógliia, do número de *endpoints* e do comprimento das ramificações de micrógliia em todos os animais WT e IFN- γ /KO. Foi encontrado aumento no número de micrógliia, diminuição do número de *endpoints* e do comprimento das ramificações de micrógliia no estriado lesionado dos animais IFN- γ /KO/L-DOPA. (A) Número de corpos celulares de micrógliia; (B) Número de *endpoints*/número de células; (C) Somatória do comprimento das ramificações/número de células. + $p < 0,01$ em comparação ao lado contralateral. * $p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo WT. & $p = 0,06$ em comparação ao respectivo grupo WT. # $p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo salina. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 5-7$ por grupo. Sal: Salina. LD: L-DOPA.

Figura 27. Fotomicrografias representativas da imunomarcção de Iba-1. Animais WT e IFN- γ /KO lesionados com 6-OHDA e tratados com salina ou L-DOPA apresentaram imunomarcção para iba-1 (marcador de micróglia) no estriado dorsolateral lesionado. O grupo IFN- γ /KO L-DOPA apresentou aumento de micróglia, em comparação ao grupo WT. Bregma: +0,74. Aumento de 5x (a esquerda) e de 40x (a direita).

Avaliação da expressão de GFAP

A expressão de GFAP (utilizado como marcador para astrócitos) foi investigada na extensão rostrocaudal do estriado dorsolateral (Figura 29). Foi observado aumento do número de astrócitos no estriado lesionado dos animais IFN- γ /KO/L-DOPA, quando comparado aos animais WT/L-DOPA (cerca de 36% maior) e IFN- γ /KO salina (cerca de 57% maior) (Figura 28A; $F(3, 35) = 9,191$; $p < 0,01$). Comparado ao hemisfério não lesionado, houve aumento do número de astrócitos no estriado dorsolateral lesionado em todos os animais ($F(1, 35) = 157$; $p < 0,01$).

Para os astrócitos foi ainda quantificado o número de ramificações e de intersecções e o comprimento médio das ramificações (GIOCANTI-AUREGAN et al., 2016), como indicação do processo de ativação dos astrócitos. A análise morfológica revelou aumento de cerca de 37% do número de ramificações de astrócitos no estriado dorsolateral lesionado em animais IFN- γ /KO/L-DOPA, comparado aos animais IFN- γ /KO/salina (Figura 28B; $F(3, 33) = 9,565$; $p < 0,01$). Comparado ao hemisfério não lesionado, houve aumento do número de ramificações dos astrócitos no estriado dorsolateral lesionado em todos os animais ($F(1, 33) = 113,5$; $p < 0,01$).

O número de intersecções entre as ramificações dos astrócitos do grupo IFN- γ /KO/L-DOPA, no estriado dorsolateral lesionado, foi 33% maior que o grupo IFN- γ /KO/salina (Figura 28C; $F(3, 34) = 5,448$; $p < 0,05$). Comparado ao lado não lesionado, observou-se aumento do número de intersecções entre as ramificações das células no estriado dorsolateral lesionado de todos os animais ($F(1, 34) = 94,87$; $p < 0,01$).

No estriado lesionado, o comprimento médio das ramificações dos animais IFN- γ /KO/L-DOPA foi aproximadamente 31% maior que no grupo IFN- γ /salina (Figura 28D; $F(3, 33) = 16,52$; $p < 0,01$). Houve tendência ao aumento do comprimento das ramificações do grupo IFN- γ /KO/L-DOPA, comparado ao grupo WT/L-DOPA ($p = 0,06$). Comparado ao estriado não lesionado, o comprimento das ramificações de astrócitos estava aumentado no estriado dorsolateral nos grupos de animais WT/salina e em todos os animais IFN- γ /KO ($F(1, 33) = 59,28$; $p < 0,01$).

Figura 28. Análise da morfologia de astrócitos no estriado lesionado e não lesionado após tratamento crônico com L-DOPA. Em animais WT e IFN- γ /KO foi encontrado aumento do número de astrócitos, do número de ramificações e intersecções no estriado dorsolateral após lesão. O tratamento com L-DOPA promoveu, em animais IFN- γ /KO, o aumento do número de astrócitos, ramificações, intersecções e do comprimento médio das ramificações, comparados ao grupo salina/WT L-DOPA. (A) Número de astrócitos; (B) Somatória do número de ramificações de astrócitos/mm²; (C) Somatória do número de intersecções/mm²; (D) Média do comprimento de ramificações dos astrócitos. + $p < 0,05$ em comparação ao respectivo lado contralateral. * $p < 0,01$ em comparação ao respectivo grupo WT. # $p < 0,05$ em comparação ao respectivo grupo salina. & $p = 0,06$ em comparação ao respectivo grupo WT. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. $n = 5-7$ por grupo. Sal: Salina. LD: L-DOPA.

Figura 29. Fotomicrografias representativas da imunomarcção de GFAP. Animais WT e IFN- γ /KO lesionados com 6-OHDA e tratados com salina ou L-DOPA apresentaram imunomarcção para GFAP (marcador de astrócitos) no estriado dorsolateral lesionado. O grupo IFN- γ /KO L-DOPA apresentou aumento de astrócitos, em comparação aos demais grupos. Bregma: +0,5. Aumento de 5x (a esquerda) e de 40x (a direita).

Correlações entre os escores de discinesia e a expressão de marcadores neuroinflamatórios

Foram realizadas análises de correlação de Pearson entre a somatória dos escores de discinesia dos animais hemiparkinsonianos WT e IFN- γ /KO e a presença dos marcadores de neuroinflamação, iNOS, micróglia e astrócitos ativados no estriado ipsilateral à lesão (Figura 30).

Não houve correlação positiva entre os escores de discinesia e o número de células iNOS⁺ no estriado lesionado de animais WT ($r=0,63$; $p>0,05$) e IFN- γ /KO ($r=0,5$; $p>0,05$) (Figura 30A-B). Foi encontrada correlação positiva entre a intensidade dos escores de discinesia e o número de micróglia no estriado lesionado de ambos os grupos de animais WT ($r=0,84$; $p<0,05$) e IFN- γ /KO ($r=0,83$; $p<0,05$) (Figura 30C-D). Não houve correlação positiva entre a intensidade dos escores de discinesia e o número de astrócitos no estriado lesionado de nenhum dos animais WT ($r=0,43$; $p>0,05$) e IFN- γ /KO ($r=0,49$; $p>0,05$) (Figura 30E-F).

Figura 30. Correlação positiva entre escores de discinesia de expressão de iNOS, micróglia e astrócitos. Foi analisada correlação entre a intensidade dos escores de discinesia e (A) e (B) a expressão iNOS; (C) e (D) do número de micróglia; (E) e (F) do número de astrócitos no estriado lesionado de animais WT e IFN- γ /KO no estriado lesionado por 6-OHDA. Correlação de Pearson. $n=5-6$ por grupo.

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar se a ausência de IFN- γ interfere (i) sobre a degeneração de neurônios dopaminérgicos promovida pela 6-OHDA, (ii) no desenvolvimento de discinesia induzida por L-DOPA nos animais hemiparkinsonianos (iii) na expressão de marcadores de neuroinflamação.

A deleção do gene de IFN- γ não acarretou em alterações na evolução da lesão ao longo de 21 dias após microinjeção de 6-OHDA. Da mesma forma, não interferiu no desenvolvimento da LID. Ainda, a deficiência na produção de IFN- γ não influenciou na expressão de FosB no estriado lesionado de animais apresentando discinesia.

O tratamento com L-DOPA nos animais IFN- γ /KO aumentou a expressão de neurônios TH⁺ e de fatores neuroinflamatórios, como a enzima iNOS e número de micróglia e astrócitos, no estriado com lesionado. Este aumento foi superior ao observado em animais WT apresentando discinesia. Foi observada correlação positiva entre a intensidade da discinesia e o número de micróglia presente no estriado lesionado dos animais WT e IFN- γ /KO. Não houve significância estatística na correlação entre a intensidade de discinesia e o aumento da expressão de iNOS ou astrócitos no estriado lesionado.

Mecanismos subjacentes à DP

A investigação dos mecanismos subjacentes à DP, bem como de novos tratamentos para a doença, conta com potenciais ferramentas para o seu entendimento, como a utilização de modelos animais que reproduzem parcialmente a fisiopatologia e sintomatologia da DP. Muitos modelos contam com a ação de neurotoxinas (6-OHDA e o MPTP) que induzem notável degeneração da via nigroestriatal. Estas toxinas, quando chegam aos neurônios, inibem o complexo I da mitocôndria e induzem consequente estresse oxidativo (GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015; ZENG; GENG; JIA, 2018). Entretanto, a neurodegeneração causada por tais toxinas é muito rápida, a lesão é exclusivamente dopaminérgica e os animais não desenvolvem os agregados proteicos característicos de pacientes com DP. No modelo que utiliza o MPTP, a toxina é injetada sistemicamente, atravessando a barreira hematoencefálica, onde é captada por células da glia e convertida em seu metabólito ativo MPP⁺ pela enzima MAO-B. O MPP⁺ é então recaptado por DAT, entra nos neurônios dopaminérgicos, causando morte neuronal (GUBELLINI; KACHIDIAN, 2015). No nosso estudo, o modelo utilizado para induzir a degeneração da via nigroestriatal foi o da 6-OHDA, que possui estrutura molecular semelhante à da DA. A 6-OHDA pode ser recaptada pelos neurônios por meio da

DAT, como um “falso neurotransmissor”; sofre rapidamente oxidação, gerando componentes citotóxicos que aumentam o estresse oxidativo, levando à morte celular (SCHWARTING; HOUSTON, 1995; ZENG; GENG; JIA, 2018). Uma vez que a 6-OHDA não ultrapassa a barreira hematoencefálica, deve ser injetada diretamente no estriado, na SNc ou no feixe prosencefálico medial, causando em poucos dias perda dos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais (UNGERSTEDT, 1968).

No presente estudo, o sítio de injeção da 6-OHDA foi o estriado dorsolateral, considerando a ação retrógrada da toxina, que inicia pela rápida degeneração dos terminais dopaminérgicos, seguido pela morte dos neurônios da SNc. A lesão foi realizada unilateralmente, de forma a produzir prejuízos motores unilaterais, como acinesia do membro anterior verificado por meio do teste do cilindro (SCHALLERT et al., 2000). Além disso, o modelo torna-se bastante atrativo pelo fato de que o estriado contralateral a lesão pode servir como o próprio controle de cada animal.

Deficiência de IFN- γ e a lesão induzida por 6-OHDA

Para determinar se animais com deficiência na produção de IFN- γ (KO) desenvolveriam a lesão induzida por 6-OHDA da mesma forma que animais selvagens (WT), foi realizada análise do *time-course* da degeneração dopaminérgica. Em ambos os grupos de animais, a lesão se desenvolveu de maneira semelhante. Após 1 dia da microinjeção de 6-OHDA, o estriado apresentou diminuição da imunomarcagem para a enzima TH, indicativo da lesão de neurônios dopaminérgicos. A lesão progrediu rapidamente após três dias da cirurgia e a partir do 7º dia estabilizou-se; cerca de 85% do estriado apresentou denervação. Na SNc, após 1 dia da microinjeção de 6-OHDA foi possível observar redução da expressão de TH, apesar de um pouco mais branda do que no estriado. Apenas a partir do 7º dia após a cirurgia é que a imunomarcagem para TH diminuiu na SNc, e no 21º dia alcançou em torno de 83% de morte de neurônios dopaminérgicos. Nossos resultados são semelhantes aos descritos em outros trabalhos (BLANDINI et al., 2007; STOTT; BARKER, 2014; RENTSCH et al., 2019), onde a microinjeção de 6-OHDA causou perda dos terminais dopaminérgicos no estriado, seguido de morte dos neurônios da SNc.

Em contraste, o parkinsonismo induzido pela inoculação de MPTP (MOUNT et al., 2007) e de paraquat (LITTELJOHN et al., 2009b; MANGANO et al., 2012) investigado em animais IFN- γ /KO, apresentou neuroproteção. O fato de que neste estudo a ausência de IFN- γ não interferiu no desenvolvimento da lesão, pode ser explicado por diferenças no mecanismo

de ação das neurotoxinas. A dose de 6-OHDA aqui utilizada provocou robusta perda dos neurônios e terminais dopaminérgicos, enquanto que a depleção dopaminérgica induzida por MPTP ou paraquat nos trabalhos apresentados foi parcial. Além disso, as neurotoxinas agem de forma diferente. Considerando a intrínseca relação entre o IFN- γ e as células da glia, necessárias para a conversão do MPTP em seu metabólito tóxico MPP⁺, é razoável pensar na participação do IFN- γ sobre a degeneração dopaminérgica induzida por tal toxina. No caso da 6-OHDA, que é diretamente recaptada para os neurônios dopaminérgicos, não há interferência da ação das células da glia.

Dessa forma, seria interessante investigar se, em doses mais baixas de 6-OHDA, os animais IFN- γ /KO apresentariam menor nível de lesão que animais WT. Contudo, se consideramos que estes animais apresentam deficiência na produção de IFN- γ desde o nascimento, e que tal característica não é flutuante ou dependente de drogas, era de se esperar que uma vez induzida lesão dopaminérgica que provocasse reação neuroinflamatória dependente de IFN- γ , estes animais nocautes estariam, em algum grau, protegidos dessa lesão.

Uma alternativa para responder a essa questão, seria a investigação por modelos onde a ativação microglial é o gatilho para a lesão da via nigroestriatal, como no caso da injeção de LPS (GAO et al., 2002; LING et al., 2002, 2006), e não onde ela acontece por estresse oxidativo e a neuroinflamação ocorre como consequente da morte neuronal, como no caso da 6-OHDA e MPTP. Curiosamente, a injeção intranigral de IFN- γ não foi capaz de reproduzir o efeito do LPS em causar ativação glial e a perda de neurônios dopaminérgicos (CASTAÑO et al., 2002). Juntamente com os nossos resultados, esse fato poderia sugerir que as respostas inflamatórias que ocorrem na neurodegeneração causada por 6-OHDA, podem ser pelo menos em parte, independentes de IFN- γ .

Para aprofundar a análise do papel do IFN- γ em nosso modelo de lesão induzida por 6-OHDA, avaliamos os níveis dessa citocina em quatro intervalos (1, 3, 7 e 21 dias) após lesão. Dessa vez corroborando com a literatura, encontramos aumento da concentração de IFN- γ no estriado lesionado. Da mesma maneira, foi encontrado níveis aumentados de IFN- γ no plasma (MOUNT et al., 2007), no estriado e SNc (MOGI et al., 2007) de pacientes com DP; em animais, utilizando 6-OHDA (HERNANDES et al., 2013) e também em outros modelos animais da DP (LUCHTMAN; SHAO; SONG, 2009; KRASHIA et al., 2019). No decorrer do desenvolvimento da lesão até o 21º dia, os níveis de IFN- γ mantiveram-se constantes. Entretanto, após 42 dias da cirurgia já não foi mais possível detectar a citocina no estriado lesionado (dados suplementares). Estas observações sugerem que a possível contribuição do IFN- γ na degeneração dos neurônios não perdura após o estabelecimento da lesão. Contudo

tais resultados precisam ser mais profundamente investigados, uma vez que nossas medidas de IFN- γ após 42 dias da lesão ficaram abaixo da curva padrão.

Deleção de IFN- γ em testes comportamentais

Uma vez observado o aumento de IFN- γ no estriado lesionado, analisamos o papel da deleção do gene desta citocina no comportamento motor espontâneo, avaliado pelo teste do campo aberto, antes e após o estabelecimento da lesão dopaminérgica.

Em condições basais, a ausência de IFN- γ alterou a mobilidade dos animais, que apresentaram reduzida exploração, número de rotações e velocidade média e aumento do tempo de imobilidade. O prejuízo locomotor causado pela injeção de 6-OHDA foi proporcionalmente igual nos animais WT e IFN- γ /KO. Em ambos os grupos de animais, após o estabelecimento da lesão o tempo de imobilidade aumentou; por sua vez a exploração do aparato e o número de rotações foram reduzidos.

Anormalidades no comportamento motor, após indução de parkinsonismo, já haviam sido frequentemente observadas em outros estudos com roedores (YOUNG; ERVIN; SMITH, 1976; KUMARI; KUMAR; LUTHRA, 2015; SILVA et al., 2016). A degeneração da via nigroestriatal causou diminuição da distância percorrida e exploração no campo aberto (MACHADO-FILHO et al., 2014; NEVES et al., 2015; XIMENES et al., 2015; LIANG et al., 2019), como também prejudicou a coordenação motora dos animais (KUMARI; KUMAR; LUTHRA, 2015; LIANG et al., 2019). Não há um consenso sobre o efeito do IFN- γ na locomoção e os estudos apresentaram resultados contraditórios. Corroborando nossos resultados, em condições normais, os animais IFN- γ /KO apresentaram aumento da imobilidade e diminuição da distância percorrida no campo aberto (KUSTOVA et al., 1998; LITTELJOHN et al., 2009b). Outros autores não observaram alterações no comportamento motor de tais animais (CAMPOS et al., 2014; MONTEIRO et al., 2015). Ainda, o tratamento com IFN- γ parece diminuir a atividade locomotora (WEINBERGER et al., 1988; CRNIC; SEGALL, 1992). A alteração do comportamento motor dos animais nocaute, observada por nós e por outros autores, poderia ser concebida em decorrência de mudanças compensatórias associadas à perda da citocina em momentos críticos no desenvolvimento do SNC, afetando processos motivacionais e/ou afetividade (LITTELJOHN et al., 2009a; CAMPOS et al., 2014).

Após a constituição da lesão dopaminérgica, utilizamos o teste do cilindro para avaliar a acinesia do membro anterior (SCHALLERT et al., 2000). O teste do cilindro se baseia na

tendência natural de roedores à exploração de novos ambientes, apoiando-se nos membros posteriores e usando os membros anteriores para se apoiar nas paredes do aparato. A microinjeção unilateral de 6-OHDA causou robusta diminuição do uso da pata contralateral à lesão, o que sugere extensa degeneração dos neurônios dopaminérgicos, em ambos os grupos WT e IFN- γ /KO, assim como já observado em estudos anteriores (LUNDBLAD et al., 2002; PICCONI et al., 2003). Além do teste do cilindro, muitos outros testes comportamentais já validados, como o da rotação induzida por apomorfina e o rotarod, são utilizados para avaliar as perturbações no comportamento motor observadas em modelos animais da DP, de forma a confirmar a efetividade da lesão dopaminérgica (CENCI; LUNDBLAD, 2005).

Deleção de IFN- γ e a indução da discinesia por L-DOPA nos animais parkinsonianos

Uma vez confirmada a lesão da via nigroestriatal, foi iniciado o tratamento com L-DOPA por 21 dias a fim de induzir a manifestação dos AIMs (CENCI; LUNDBLAD, 2007; SEBASTIANUTTO et al., 2016). Apesar de ser o tratamento farmacológico mais utilizado para a DP, a cronicidade do uso da L-DOPA leva ao aparecimento de discinesia, afetando a maior parte dos pacientes (AHLISKOG; MUENTER, 2001; HAUSER et al., 2007). A prevenção ou redução da LID, sem comprometer os seus efeitos benéficos no tratamento da DP, é um importante objetivo para a pesquisa. Desse modo, modelos animais para o estudo da LID são peças fundamentais para a elucidação dos seus mecanismos fisiopatológicos e tratamentos para este distúrbio. Pela primeira vez introduzida por Lundblad et al. (2004), a escala de avaliação dos AIMs define a severidade da LID, baseada na intensidade e frequência dos comportamentos avaliados após o tratamento com L-DOPA. Esta escala foi validada e é amplamente utilizada no estudo da discinesia em roedores (PAVÓN et al., 2006; DOS-SANTOS-PEREIRA et al., 2016; PADOVAN-NETO et al., 2013).

Assim como descrito em outros trabalhos (BIDO; MARTI; MORARI, 2011; SMITH et al., 2012; MANGO et al., 2014), encontramos que desde o primeiro dia de tratamento com L-DOPA, os camundongos hemiparkinsonianos já começaram a apresentar AIMs dos três tipos, orofacial, axial e do membro anterior. Tais comportamentos apareceram desde os primeiros 20 minutos após a administração de L-DOPA, e perduraram por até 120 minutos após a injeção. Os AIMs foram analisados no 1º, 7º, 14º e 21º dia de tratamento farmacológico e permaneceram constantes ao longo do período de tratamento em todos os animais. Da mesma forma como os AIMs, ao longo do período do tratamento foram verificados giros contralaterais à lesão, induzidos por L-DOPA. Em animais WT e IFN- γ /KO,

as rotações estão presentes desde o primeiro dia de tratamento e permaneceram constantes até o 21º dia.

Como demonstrado pelo nosso grupo (BORTOLANZA et al., 2015a), em animais hemiparkinsonianos e apresentando discinesia houve aumento da expressão de iNOS no estriado ipsilateral à lesão. Considerando que o IFN- γ participa da via de transcrição de iNOS, hipotetizamos que a ausência de IFN- γ poderia interferir no desenvolvimento da LID. Até o momento, a participação do IFN- γ na discinesia ainda não havia sido investigada. Surpreendentemente, a deficiência de IFN- γ não influenciou no aparecimento dos AIMs e os animais IFN- γ /KO apresentaram os escores semelhantes de discinesia que animais WT, durante todo o período de tratamento com L-DOPA.

Além do IFN- γ , o papel de outras citocinas na LID já foi investigado. Citocinas são os principais produtos solúveis da micróglia e tem papel fundamental na reação imune frente a estímulos nocivos. Elas possuem papel determinante na fisiopatologia da DP, por sustentar e promover a neurodegeneração dopaminérgica (HIRSCH; HUNOT, 2009) e também contribuem para a reação inflamatória existente na LID (PISANU et al., 2018; BOI et al., 2019). Em consoante, foi observado um aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β (BARNUM et al., 2008) e TNF- α (MULAS et al., 2016) no estriado lesionado após injeção de L-DOPA. Ademais, drogas com ação imunomodulatória, como a corticosterona (BARNUM et al., 2008), a rosiglitazona, um agonista do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma- γ (PPAR- γ ; MARTINEZ et al., 2015), e talidomida, um anti-inflamatório (BOI et al., 2019), possuem efeitos anti-discinéticos no modelo animal de DP. Este último estudo ainda observou diminuição dos níveis TNF- α e aumento da citocina anti-inflamatória IL-10, no estriado e SNr (BOI et al., 2019). Em contraste com nossos resultados, as evidências acima indicam que há contribuição das citocinas pró-inflamatórias para a manifestação da LID. Apesar disso, nossos resultados sugerem que o desenvolvimento de discinesia não depende da ação específica de IFN- γ .

Dado que os animais IFN- γ /KO exibiram prejuízo no comportamento motor em condições basais, observada pela análise da locomoção no campo aberto, haveria possibilidade de que tal condição compromettesse os comportamentos do tipo discinético. Estes animais nocaute, entretanto, apresentaram escores de AIMs na mesma intensidade que os animais WT. Ainda, apesar de não ser estatisticamente significativo, houve tendência ao aumento do número de giros pelo grupo IFN- γ /KO, comparado ao grupo WT, a partir do 7º dia de avaliação. Esses resultados poderiam indicar que a L-DOPA recebida pelos animais IFN- γ /KO conseguiu reverter esse prévio prejuízo motor.

A interação de IFN- γ e L-DOPA ou DA no SNC é pobremente estudada, mas ambas parecem interagir de maneira antagônica (CARR; TUCKER; FERNANDEZ-BOTRAN, 2003; MAGRO et al., 2004). Alguns estudos encontraram que a injeção de L-DOPA ou DA na periferia tem ação imunomodulatória, com inibição da produção de IFN- γ , pela estimulação de receptores D2 (CARR; TUCKER; FERNANDEZ-BOTRAN, 2003). Estes autores sugerem que o aumento periférico da DA ou de seus agonistas podem diminuir níveis endógenos de prolactina, com subsequente inibição de respostas do tipo inflamatórias e produção de citocinas. Da mesma maneira, o aumento sistêmico de produção de IFN- γ , analisado no plasma de ratos, foi acompanhado de diminuição da DA na mucosa inflamada do intestino, sugerindo que o IFN- γ possui ação inibitória sobre a captação da DA por células epiteliais intestinais (MAGRO et al., 2004). Estudos futuros poderiam investigar a relação entre níveis de DA e produção de IFN- γ , no SNC.

Deleção de IFN- γ , discinesias e expressão de TH em neurônios estriatais

Após a avaliação da discinesia, a fim de nos assegurarmos da lesão da via nigroestriatal, foi verificada a imunorreatividade para a enzima TH. Nós observamos robusta perda de terminais e neurônios dopaminérgicos no estriado e SNc, respectivamente, e não encontramos diferenças na imunorreatividade para TH entre os grupos WT e IFN- γ /KO, tratados com salina ou L-DOPA. O grau da lesão induzida por 6-OHDA ou MPTP parece estar correlacionada com a severidade dos AIMs (DI MONTE et al., 2000). A redução de fibras dopaminérgicas estriatais acima de um valor crítico de limiar é pré-requisito necessário para que camundongos desenvolvam LID (LUNDBLAD; PICCONI; CENCI, 2004). Consequentemente, já era esperado que, uma vez demonstrado comportamento semelhante no teste do cilindro e na avaliação da discinesia, não encontraríamos diferenças na intensidade da lesão dopaminérgica de ambos os animais WT e IFN- γ /KO.

Corroborando com os achados de estudos anteriores (DARMOPIL et al., 2008; ESPADAS et al., 2012; BUSCETI et al., 2012), no estriado lesionado de animais que receberam L-DOPA, mas não salina, foi detectada a presença de corpos celulares neuronais com imunomarcção TH⁺. O número total de tais neurônios foi significativamente maior no estriado de animais IFN- γ /KO, que em animais WT. No estudo realizado por Darmopil et al. (2008), os autores relataram a presença desses neurônios no estriado três dias após lesão por 6-OHDA. Após uma semana, houve diminuição progressiva do número de neurônios TH⁺, porém o início do tratamento com L-DOPA, aumentou o número e a intensidade da imunomarcção de tais neurônios. Além disso, o efeito da L-DOPA parece ser dose-

dependente e a presença destes neurônios persistiu por alguns dias após o término do tratamento.

O papel dos neurônios estriatais TH⁺ ainda não está completamente elucidado e estudos apontam evidências contraditórias para sua função. Nossos resultados parecem indicar que estes neurônios não possuem influência sobre a LID, pois apesar da diferença no número dos neurônios TH⁺ entre WT e IFN- γ /KO, os escores de discinesia dos dois grupos de animais não foi diferente. Além do mais, enquanto os neurônios TH⁺ induzidos por L-DOPA são evidentes por mais de 4 dias após tratamento farmacológico, os AIMs não duram por mais de 3 horas (WESTIN et al., 2007b; DARMOPIL et al., 2008). Resultados contraditórios aos nossos foram encontrados por outros autores. Utilizando dose de L-DOPA mais baixa que neste estudo, foi observado que as células estriatais TH⁺, juntamente com terminais serotoninérgicos, podem cooperativamente sintetizar DA e contribuir a patogênese da LID. O número de neurônios TH⁺ foi positivamente correlacionado com a intensidade dos AIMs (KEBER et al., 2015). Apesar disso, foi demonstrado que a L-DOPA diminuiu a expressão de RNAm de TH no estriado com depleção dopaminérgica (KLIETZ et al., 2016). Alguns estudos sugerem que estes neurônios sejam de projeção das vias direta e indireta, visto que eles se co-localizam com dinorfina, encefalina e também com FosB (DARMOPIL et al., 2008; ESPADAS et al., 2012). Outro estudo mais recente demonstrou que estes neurônios não produzem DA. Eles parecem ser interneurônios gabaérgicos e, apesar de expressarem TH, não apresentam outras enzimas ou transportadores necessários para funcionarem como neurônios dopaminérgicos (XENIAS et al., 2015). Contudo, ainda não se conhece os mecanismos celulares responsáveis pela indução do fenótipo de tais neurônios e como estes podem estar relacionados com a presença de IFN- γ .

Deleção de IFN- γ e expressão de FosB

O desenvolvimento da discinesia está associado com mudanças na expressão de genes e proteínas no estriado lesionado (PAVÓN et al., 2006). Há correlação positiva entre os escores de AIMs e níveis estriatais de RNAm de prodinorfina e de FosB (Andersson *et al.*, 2001, Cenci *et al.*, 1998, Winkler *et al.*, 2002). Desse modo, investigamos se a ausência de IFN- γ poderia influenciar na expressão de FosB. Em ambos os grupos de animais WT e IFN- γ /KO que receberam L-DOPA, houve um aumento semelhante da imunomarcagem de FosB no estriado lesionado. Uma vez que não observamos diferença nos escores de discinesia entre os

animais WT e IFN- γ /KO, não esperávamos encontrar alterações na expressão de FosB entre os grupos.

Nossos resultados estão de acordo com o que já foi descrito na literatura (WINKLER et al., 2002; CALON et al., 2003; PADOVAN-NETO et al., 2013). A imunorreatividade para FosB/ Δ FosB apresenta níveis basais de expressão no estriado e animais microinjetados com salina no estriado, e não 6-OHDA, não apresentaram regulação positiva da imunomarcção de FosB/ Δ FosB, mesmo quando recebem altas doses de L-DOPA (LUNDBLAD; PICCONI; CENCI, 2004). Ainda em modelos animais, a expressão de FosB/ Δ FosB no estriado aumenta em consequência da lesão da via nigroestriatal, e eleva-se ainda mais após a cronicidade da administração de L-DOPA, permanecendo mesmo após a interrupção do tratamento (WINKLER et al., 2002; CALON et al., 2003). Em pacientes com DP e discinéticos também foi observado expressão de Δ FosB no núcleo caudado e putâmen (TEKUMALLA et al., 2001; LINDGREN et al., 2010). FosB/ Δ FosB parecem ter papel fundamental para mediar as alterações neuronais duradouras que contribuem para o fenótipo discinético. Por exemplo, em ratos e macacos nos modelos da DP, a desativação seletiva de FosB/ Δ FosB no estriado parece amenizar a LID (ENGELN et al., 2014). O efeito anti-discinético da inibição de NOS, pelo 7-nitroindazole (7-NI) está relacionado à diminuição da expressão de FosB/ Δ FosB (PADOVAN-NETO et al., 2015, 2013). Portanto, é sugerido que os AIMs se desenvolvam em decorrência de mecanismos pós-sinápticos relacionados, em algum grau, com a expressão de FosB (CAO et al., 2010).

Deleção de IFN- γ influencia a expressão de iNOS

É sabido que, além de citocinas, a enzima iNOS participa da reação neuroinflamatória presente na DP (MOGI et al., 2007). A iNOS é constitutivamente expressa em baixos níveis pelo SNC, onde geralmente está associada a células da glia (DOHERTY, 2011). Diferente das demais isoformas da NOS, a iNOS exige estimulação apropriada por muitos fatores, como as citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (CHAO et al., 1996). Altos níveis dessa enzima foram encontrados na SN e estriado de cérebros de pacientes com DP (HUNOT et al., 1996; KNOTT; STERN; WILKIN, 2000) e em ratos com lesão nigroestriatal (NEVES et al., 2015). Inúmeros estudos demonstraram que a prevenção da perda dopaminérgica da via nigroestriatal está associada à diminuição da expressão de iNOS e estresse oxidativo em modelos animais DP (CHUNG; KIM; JIN, 2010; NEVES et al., 2015; XING et al., 2007).

Trabalhos recentes demonstraram que, em ratos hemiparkinsonianos o tratamento com L-DOPA é capaz de causar o aumento da expressão da enzima iNOS no estriado lesionado

por 6-OHDA (BORTOLANZA et al., 2015a; MULAS et al., 2016). Considerando que o IFN- γ é uma das citocinas que participa da via de transcrição da iNOS, investigamos se esse aumento de iNOS observado em animais discinéticos seria dependente da participação de IFN- γ . De acordo com nossa hipótese, a L-DOPA estaria atuando por meio de IFN- γ para promover a expressão de iNOS.

Nossos resultados com animais WT corroboram com a literatura, onde houve aumento da expressão de iNOS no hemisfério lesionado. Ainda, os animais que receberam L-DOPA tiveram expressão de iNOS superior aos animais tratados com salina. Surpreendentemente, os animais IFN- γ /KO discinéticos apresentaram expressão de iNOS superior aos animais WT, apesar de apresentarem os mesmos escores de discinesia. Esse resultado sugere que a L-DOPA estaria atuando por outra via, que não a de sinalização do IFN- γ , na indução da expressão de iNOS.

Até o momento, não se conhecia o perfil de expressão de iNOS nos animais IFN- γ /KO, em nosso modelo de DP e LID. As células imunes em repouso não produzem a iNOS, entretanto, uma variedade de estímulos externos pode ativar vias de sinalização distintas que convergem para iniciar a sua expressão. As duas maiores vias conhecidas que influenciam na transcrição e expressão de iNOS em macrófagos são: a via proteína-quinase ativada por mitógenos (MAPK) e a via JAK/STAT. Tanto LPS como TNF- α podem ativar a via MAPK, que em seguida ativam NF- κ B e a proteína ativadora 1 (AP1), principais fatores de transcrição pró-inflamatória. O IFN- γ , por outro lado, ativa a via JAK/STAT, que leva à formação de dímeros STAT1 fosforilados e à ativação do fator regulador de interferon-1 (IRF1), outros dois fatores de transcrição usados na regulação da transcrição da iNOS. Ambas as vias são individualmente capazes de induzir a expressão de iNOS, mas a ação sinérgica das duas vias amplificam a resposta uma da outra. Consequentemente, na presença de todos estes fatores de transcrição, a expressão do gene da iNOS é otimizada (SALIM; SERSHEN; MAY, 2016).

O fato de não haver diminuição da expressão de iNOS no estriado dos animais IFN- γ /KO, se explica em decorrência de a via ativada por IFN- γ não ser a única fonte de ativação da transcrição de iNOS. Outras citocinas, como TNF- α e IL-1 β , que também estão presentes no cérebro de pacientes com DP (MOGI et al., 2007), além de fatores de transcrição como NF- κ B (HUNOT et al., 1997; FLOOD et al., 2011), poderiam se configurar como rotas alternativas para a transcrição de iNOS. Além disso, já foi demonstrado em cultura de astrócitos que na ausência de IFN- γ , o IFN- β pode estimular a expressão de iNOS induzida por IL-1 (HUA et al., 2002). Uma hipótese alternativa para explicar os nossos resultados

envolve alterações na produção outras citocinas, promovidas pela falta de IFN- γ durante a maturação do SNC, alterando a expressão de outros genes como um mecanismo compensatório. Dessa forma, em vista de estímulos inflamatórios, como a lesão por 6-OHDA e o tratamento com L-DOPA (DEL-BEL et al., 2016), ao contrário de haver diminuição da expressão de iNOS, como seria o esperado em animais IFN- γ /KO, o possível aumento das outras citocinas como TNF- α , IL-1 β e até mesmo IFN- β , que também participam da produção de iNOS, poderiam levar à consequente elevação da expressão desta enzima.

Deleção de IFN- γ influencia na expressão de astrócitos e da microglia

Além da participação da iNOS nos processos inflamatórios presentes na DP e na LID, estudos têm demonstrado a contribuição da micróglia e dos astrócitos nestes distúrbios (BORTOLANZA et al., 2015a; DEL-BEL et al., 2016; MULAS et al., 2016; PISANU et al., 2018). Corroborando com resultados anteriores (CASTAÑO et al., 2002; CZŁONKOWSKA et al., 1996; RODRIGUES; GOMIDE; CHADI, 2001), no presente estudo observamos o aumento do número de micróglia e de astrócitos no estriado lesionado com 6-OHDA em ambos os grupos de animais WT e IFN- γ /KO.

A micróglia é o tipo de célula imune mais abundante no SNC, onde interage com neurônios e exibe amplas funções em condições fisiológicas e patológicas. Quando ativada, a micróglia secreta fatores pró- ou anti-inflamatórios que podem exacerbar ou aliviar a progressão de doenças (HO, 2019). Ela pode desencadear neuroinflamação pela liberação massiva de IL-1 β , TNF- α e iNOS, entre outros fatores inflamatórios. Por outro lado, a micróglia ativada pode também secretar mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β , como forma de diminuir a inflamação (HANISCH, 2013; MORGANTI et al., 2016; RANSOHOFF et al., 2016).

Entre muitas outras funções, os astrócitos são responsáveis pela manutenção da homeostase do cérebro, por meio da absorção de íons e neurotransmissores, e fornecem fatores de crescimento e metabólitos para os neurônios. Em resposta ao dano, os astrócitos se tornam ativados, num processo denominado de astrogliose. Eles agem rapidamente em resposta ao estresse oxidativo, inibindo o excesso de inflamação pela regulação da ativação microglial. Ao mesmo tempo, os astrócitos também produzem e respondem à citocinas. Eles expressam receptores para uma ampla gama de mediadores inflamatórios, o que possibilita mecanismos de sinalização entre os astrócitos e diferentes tipos celulares, contribuindo para a interação neuroimune (SOFRONIEW; VINTERS, 2010).

Ativação da micróglia e de astrócitos parece ser importante parte do processo fisiopatológico da DP, seja como causa ou consequência da morte de neurônios DA (BLOCK, 2007; KANNARKAT; BOSS; TANSEY, 2013). A elevação dos níveis de citocinas é parte do processo de ativação glial que pode iniciar, acompanhar ou persistir a neurodegeneração conforme o curso da DP (KNOTT; STERN; WILKIN, 2000; IMAMURA et al., 2003). Além disso, o tratamento com L-DOPA é capaz de potencializar a reação inflamatória pré-existente na DP, demonstrado pelo dramático aumento da ativação microglial e astrogliose (BORTOLANZA et al., 2015a; MULAS et al., 2016). Ao mesmo tempo, a diminuição da discinesia está associada à diminuição da ativação das células da glia (BARNUM et al., 2008; BORTOLANZA et al., 2015a).

Foi também realizada avaliação da morfologia da micróglia e astrócitos. Utilizamos um método objetivo de análise que indicasse, por meio dos parâmetros medidos, o estado reativo destas células. A morfologia da micróglia pode servir como um indicador das suas diversas funções celulares e de injúria cerebral. No estado de repouso, ela possui morfologia amplamente ramificada e corpo celular pequeno e redondo. Já em seu estado reativo, ela passa por processo de mudança na sua forma, onde há diminuição do número de processos e da extensão dos mesmos, que progressivamente vão se atenuando até que a célula apresente característica ameboide (STENCE; WAITE; DAILEY, 2001). A ramificação da micróglia é complexa e possui múltiplos processos que frequentemente são descritos pelo número de pontos de terminação (*endpoints*) e comprimento das suas ramificações (YOUNG; MORRISON, 2018). Em nosso estudo, a análise das modificações na morfologia da micróglia revelou diminuição do número de *endpoints* e do comprimento das ramificações no hemisfério que sofreu lesão dopaminérgica. Estes dados confirmam medidas morfológicas de estudos anteriores, que observaram redução da complexidade e do comprimento dos processos microgliais em resposta à lesão, demonstrando ativação da micróglia (FONTAINHAS et al., 2011; MORRISON; FILOSA, 2013; STENCE; WAITE; DAILEY, 2001; THANGARAJ et al., 2020).

Os astrócitos apresentam plasticidade em seus processos, em resposta a mudanças no ambiente extracelular (LEE et al., 2013; RENNER et al., 2013; THEODOSIS; POULAIN; OLIET, 2008). Em vista de estímulos nocivos, é observado que os seus processos celulares demonstram sinais de hipertrofia e frequentemente extensão de seus prolongamentos (PEKNY; NILSSON, 2005; PEKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014). Observamos no estriado lesionado de todos os grupos de animais um aumento do número de processos, verificados pela elevação do número e comprimento das ramificações, bem como do número de

intersecções entre ramificações. Estes resultados corroboram com resultados anteriores que encontraram alterações na morfologia dos astrócitos por meio destes mesmos parâmetros (WILHELMSSON et al., 2006; GIOCANTI-AUREGAN et al., 2016), como indicativo de células reativas.

Curiosamente, o tratamento com L-DOPA foi capaz induzir um singelo aumento do número de micróglia e grande elevação do número de astrócitos nos camundongos com deficiência na produção de IFN- γ , sugerindo exacerbação da reação neuroinflamatória nestes animais. Interessantemente, apesar do aumento da ativação da glia nos animais IFN- γ /KO, seus escores de discinesia foram semelhantes aos dos animais WT. Pensando nisso, fomos investigar se haveria correlação positiva entre os níveis de discinesia e a expressão de fatores inflamatórios. Nossa análise indicou correlação significativa apenas entre o aumento de micróglia e a intensidade da discinesia. Ainda não havia sido realizada análise da correlação entre a intensidade dos AIMS e os marcadores neuroinflamatórios. O que se conhece até o momento é que a intensidade da manifestação da LID se correlaciona positivamente com intensidade da lesão dopaminérgica (DI MONTE et al., 2000; WINKLER et al., 2002) e com níveis estriatais de RNAm de prodinorfina e de FosB (ANDERSSON; KONRADI; ANGELA CENCI, 2001; WINKLER et al., 2002). E, reafirmando estes resultados, não encontramos diferenças entre o grau de lesão e na expressão de FosB no estriado lesionado nos animais WT e IFN- γ /KO.

Nossos dados podem sugerir que o aumento da ativação da micróglia poderia influenciar na expressão de iNOS e de astrócitos, mas que estes fatores não seriam condição necessária para a manifestação da discinesia. Ainda, comparado aos animais WT, o ligeiro aumento do número de micróglia nos animais IFN- γ /KO/L-DOPA foi estatisticamente significativo, mas não foi suficiente para alterar os escores de discinesia destes animais. É possível que a intensidade de discinesia tivesse atingido um platô (efeito teto) e a pequena alteração na expressão de micróglia ou de astrócitos não fosse capaz de elevar ainda mais os níveis de discinesia dos animais IFN- γ /KO. Estudos futuros utilizando doses mais baixas de L-DOPA poderiam elucidar essa questão.

Já é bem conhecida a função do IFN- γ em ativar micróglia e astrócitos (DELGADO, 2003; PAWATE et al., 2004; MORAN; DUKE; GRAEBER, 2007; HANISCH, 2013). No SNC, além de ser produzido pelas células da glia (DE SIMONE; LEVI; ALOISI, 1998; KAWANOKUCHI et al., 2006; WANG; SUZUKI, 2007), muitos estudos *in vitro* demonstraram que ambos os tipos de células apresentam receptores para IFN- γ (BARCIA et al., 2011; LAVIN et al., 2014; ZHANG et al., 2014). Num estudo realizado por Barcia et al.

(2011), os autores encontraram ação sinérgica entre IFN- γ e TNF- α para a persistente ativação glial que ocorre em macacos parkinsonianos. Neste modelo, os autores ainda observaram na SNc alta expressão de IFN- γ presente na micróglia e não em astrócitos. Em contrapartida, nos astrócitos foi encontrada alta expressão de TNF- α e não na micróglia (BARCIA et al., 2011).

Pensando nestes fatos, seria de se esperar que a ausência desta citocina pudesse prevenir o aumento da expressão das células da glia, como demonstrado por estudos prévios, utilizando-se modelos animais da DP diferentes do deste trabalho (BARCIA et al., 2011; MOUNT et al., 2007). Pelo contrário, demonstramos um aumento do número de micróglia, acompanhado de grande crescimento do número de astrócitos no estriado lesionado após o tratamento com L-DOPA. Corroborando com nossos achados, no estudo de Barcia et al. (2011), a expressão de astrócitos, mas não de micróglia, estava aumentada em animais deficientes na produção de IFN- γ . Estes resultados poderiam sugerir que a participação do IFN- γ para a ativação de micróglia seria mais significativa do que sua participação na ativação de astrócitos.

Além disso, apesar de outros trabalhos demonstrarem a diminuição da ativação de micróglia em animais nocautes para o receptor de IFN- γ (TSUDA et al., 2009), esta ativação não estava completamente eliminada. Isso poderia indicar que, apesar da via de sinalização do IFN- γ ter papel importante para a ativação da micróglia, ela não é a única. Podem haver vias de sinalização independentes ou cooperativas com a de atuação do IFN- γ .

Ainda não se conhecia o padrão de expressão das células da glia nos animais deficientes para IFN- γ , frente ao tratamento com L-DOPA. Assim, da mesma forma como ocorreu o aumento da expressão de iNOS, é impossível descartar a possibilidade de que processos compensatórios decorrentes da perda de IFN- γ possam ter sido responsáveis pelo aumento da expressão e da ativação das células da glia. Assim, hipotetiza-se que as alterações genéticas do animal nocaute poderiam favorecer a expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α ou IL-1 β , que após a estimulação por L-DOPA desencadeariam o aumento robusto da expressão e ativação de micróglia e astrócitos. Estudos posteriores poderiam investigar os níveis de tais citocinas, bem como de fatores de transcrição que contribuem para a via de ativação da iNOS, como o NF- κ B, no estriado nos animais IFN- γ /KO.

CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que o IFN- γ não interfere na degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, pela ação da 6-OHDA. Evidenciam ainda que esta citocina não participa de mecanismos adjacentes ao desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA ou na expressão de FosB no estriado.

A ausência de IFN- γ influenciou, no estriado lesionado após tratamento com L-DOPA, a expressão de número de neurônios TH⁺ e da enzima iNOS, sugerindo que a L-DOPA atuaria por via de sinalização que não a do IFN- γ , para a produção de iNOS. Ainda, apresentamos evidências de que a deficiência na produção de IFN- γ pode aumentar a expressão de micróglia e astrócitos no estriado lesionado, bem como promover alterações na sua morfologia. Este fato indica que, na ausência desta citocina, há intensificação da reação inflamatória pela ação do tratamento com L-DOPA.

Estes resultados são relevantes para a compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na doença de Parkinson e da discinesia induzida por L-DOPA, ampliando o conhecimento sobre a participação de citocinas nos mecanismos neuroinflamatórios envolvidos nestes distúrbios.

MATERIAL SUPPLEMENTAR

MATERIAL SUPLEMENTAR

No experimento 2, após 21 dias da lesão unilateral por 6-OHDA, animais WT e IFN- γ /KO foram avaliados pelos os seguintes testes comportamentais (Figura Material Suplementar 1):

Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos foi utilizado para acessar memória declarativa em roedores, que se baseia na tendência natural do animal em explorar mais o objeto novo em detrimento ao familiar, num contexto conhecido (LUEPTOW, 2017). Os animais passaram por 15 minutos de habituação na arena acrílica quadrangular (40x40cm) na presença de dois objetos idênticos. No 1º dia de experimento, os animais foram submetidos a duas sessões com 1 hora de intervalo. Durante a 1ª sessão (aquisição), os animais foram expostos por 10 minutos à mesma arena com os mesmos objetos do dia da habituação. Na 2ª sessão, os animais foram expostos por 5 minutos à arena, mas um dos objetos foi substituído por outro de diferente cor e formato (novo objeto), constituindo a análise de memória de curto-prazo. 24 horas após a última exposição, os animais voltaram por mais 5 minutos na arena, onde o objeto estranho da sessão anterior havia sido substituído por outro, de diferente cor e formato (novo objeto), constituindo a análise de memória de longo-prazo. O comportamento foi gravado para contagem à cego do tempo de exploração dos objetos. O reconhecimento dos objetos para memória de curto e de longo prazo foi indicado pelo índice de discriminação (= tempo no novo objeto – tempo no objeto familiar/ tempo no novo + tempo no familiar).

Marble Burying

O teste de Marble Burying foi descrito por Angoa-Pérez et al. (2013) e avalia a tendência natural dos animais à apresentar comportamentos repetitivos, como forma de medir comportamento tipo obsessivo-compulsivo. Os animais são colocados individualmente, por 30 minutos, em uma caixa (26 cm x 48 cm x 20 cm) contendo 20 bolinhas de gude sob a superfície de maravalha. Ao final da sessão, é contado o número de bolinhas de gude enterradas pelos animais.

Suspensão pela cauda

O teste de suspensão pela cauda é utilizado para avaliar comportamento tipo depressivo em por meio da quantificação do tempo de imobilidade dos animais (CAN et al., 2011). Os camundongos foram suspensos individualmente pela cauda (presa a 2 cm da

extremidade) em uma superfície fixa, e deixados por 6 minutos em uma posição que impossibilitava que eles se apoiassem ou escapassem. Após os primeiros 60s de teste, foi contado o tempo de imobilidade dos animais.

Figura Material Suplementar 1. Avaliação comportamental em camundongos WT e IFN- γ /KO após microinjeção de 6-OHDA no estriado direito. (A) Teste de reconhecimento de objetos. Foi observado diminuição (41%) no índice de reconhecimento do novo objeto, na memória de curto prazo, dos animais IFN- γ /KO em comparação ao grupo WT. Já para memória de longo prazo, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. (B) Marble Burying. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de animais. (C) Suspensão pela cauda. Foi encontrado maior tempo de imobilidade (40%) no grupo IFN- γ /KO, comparado ao WT * $p < 0,01$ em comparação ao grupo WT. Teste t- de *Student*. $n = 10-12$ por grupo.

Experimento 3: Análise da produção de IFN- γ no soro e no estriado de animais hemiparkinsonianos e com discinesia induzida por L-DOPA.

No experimento 3, animais WT receberam microinjeção unilateral de 6-OHDA (ou salina) no estriado e após 21 dias foram analisados no teste do cilindro para confirmação da lesão dopaminérgica (Figura Material Suplementar 2). Os animais foram tratados com L-DOPA (ou salina) por 21 dias e analisados quanto aos níveis intensidade de discinesia no 1º, 7º, 14º e 21º dia de tratamento. Ao final, os animais foram sacrificados e foram analisados os níveis de IFN- γ no estriado e soro dos animais (Figura Material Suplementar 3).

Figura Material Suplementar 2. Avaliação do uso dos membros anteriores pelo teste do cilindro em camundongos após microinjeção de 6-OHDA no estriado direito. Os animais lesionados por 6-OHDA apresentaram diminuição significativa no uso do membro esquerdo (contralateral à lesão) em relação ao direito. * $p < 0,01$ vs membro direito. ANOVA de duas vias seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. $n=14-17$ por grupo.

Figura Material Suplementar 3. Avaliação temporal das discinesias e da locomoção. Os animais lesionados que receberam L-DOPA apresentaram discinesia desde o primeiro dia de tratamento e também giros contralaterais à lesão. Os animais sham que receberam L-DOPA não apresentaram discinesia. (A) Somatória das discinesias: orofacial, do membro anterior e distonia axial. (B) Somatória dos giros contralateral à lesão. * $p < 0,01$ em comparação com o grupo salina. ANOVA de duas vias de medidas repetidas seguida pelo teste de comparações múltiplas de Sidak. # $p < 0,05$ em comparação ao primeiro dia de tratamento com L-DOPA. ANOVA de uma via de medidas repetidas seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. $n = 9$ por grupo.

Análise no estriado e soro

Após a análise de discinesia, os animais foram sacrificados e foi realizado ensaio de ELISA para detecção dos níveis de IFN- γ no estriado lesionado e no soro dos animais. Contudo, as todas as amostras de estriado ficaram muito abaixo do primeiro ponto da curva (31,25 pg/ml) e não houve diferenças entre cirurgia (sham X 6-OHDA) ou de tratamento (salina X L-DOPA). Não foi encontrada leitura na análise de soro dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHLISKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Movement Disorders**, v. 16, n. 3, p. 448–458, 2001.
- ALBIN, R. L.; YOUNG, A. B.; PENNEY, J. B. The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 12, n. 10, p. 366–375, 1989.
- ALDAKHEEL, A.; KALIA, L. V.; LANG, A. E. Pathogenesis-Targeted, Disease-Modifying Therapies in Parkinson Disease. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 1, p. 6-23, 2014.
- ANDERSSON, M.; KONRADI, C.; ANGELA CENCI, M. cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 24, p. 9930–9943, 2001.
- ANGELES MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.; FRESNO, M. The role of tumour necrosis factor, interleukin 6, interferon- γ and inducible nitric oxide synthase in the development and pathology of the nervous system. **Progress in Neurobiology**, v. 56, n. 3, p. 307-340, 1998.
- ANGOA-PÉREZ, M. et al. Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 82, p. 50978, 2013.
- ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology** v. 15, n. 12, p. 1257-1272, 2016.
- BABA, Y. et al. Alterations of T-lymphocyte populations in Parkinson disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 11, n. 8, p. 493–498, 2005.
- BACH, E. A.; AGUET, M.; SCHREIBER, R. D. The IFN- γ Receptor: A Paradigm for Cytokine Receptor Signaling. **Annual Review of Immunology**, v. 15, n. 1, p. 563–591, 1997.
- BAL-PRICE, A.; BROWN, G. C. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide from Activated Glia-Inhibiting Neuronal Respiration, Causing Glutamate Release and Excitotoxicity. **Journal of Neuroscience**, v. 21, n. 17, p. 6480-6491, 2001.
- BARCIA, C. et al. IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. **Cell Death and Disease**, v. 2, n. 4, p. e142–e142, 2011.
- BARNUM, C. J. et al. Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemiparkinsonian rat: Role for interleukin-1 β . **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 30–41, 2008.
- BASTIDE, M. et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 132, p. 96-168, 2015.
- BERKE, J. D. What does dopamine mean? **Nature neuroscience**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 2018.
- BIDO, S.; MARTI, M.; MORARI, M. Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels. **Journal of Neurochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1043–1055, 2011.
- BLANDINI, F. et al. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastratial injection of 6-hydroxydopamine in the rat: New clues from an old model. **European Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 2, p. 397–405, 2007.
- BLOCK, M. ZECCA, L.; HONG, J. S Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.

- BOI, L. et al. Immunomodulatory drugs alleviate L-DOPA-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 34, n. 12, p. 1818–1830, 2019.
- BOJE, K.; RESEARCH, P. A.-B.; 1992, undefined. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. **Brain research**, v. 587, n. 2, p. 250-256, 1992.
- BOKA, G. et al. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 172, n. 1–2, p. 151–154, 1994.
- BOLAÑOS, J. P. et al. Nitric Oxide-Mediated Inhibition of the Mitochondrial Respiratory Chain in Cultured Astrocytes. **Journal of Neurochemistry**, v. 63, n. 3, p. 910–916, 2002.
- BORTOLANZA, M. et al. 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**, v. 73, p. 377–387, 2015a.
- BORTOLANZA, M. et al. Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of parkinson's disease induced by L-DOPA? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1672, p. 1–13, 2015b.
- BRAVO, S.; RANGEL-BARAJAS, C.; GARDUÑO, B. F. Pathophysiology of L-Dopa Induced Dyskinesia—Changes in D1/D3 Receptors and Their Signaling Pathway. **A Synopsis of Parkinson's Disease**, p. 119, 2014.
- BREIDERT, T. et al. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 82, n. 3, p. 615–624, 2002.
- BROCHARD, V. et al. Infiltration of CD4⁺ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 1, p. 182–192, 2009.
- CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal. **Nature Neuroscience**. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1022, 2014.
- CALON, F. et al. Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 14, n. 3, p. 404–416, 2003.
- CAMPOS, A. C. et al. Further evidence for the role of interferon-gamma on anxiety- and depressive-like behaviors: Involvement of hippocampal neurogenesis and NGF production. **Neuroscience Letters**, v. 578, p. 100–105, 2014.
- CAN, A. et al. The tail suspension test. **Journal of Visualized Experiments**, n. 58, 2011.
- CAO, X. et al. Striatal Overexpression of FosB Reproduces Chronic Levodopa-Induced Involuntary Movements. **Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 21, p. 7335-7343, 2010.
- CARR, L.; TUCKER, A.; FERNANDEZ-BOTRAN, R. In vivo administration of L-dopa or dopamine decreases the number of splenic IFN γ -producing cells. **Journal of Neuroimmunology**, v. 137, n. 1–2, p. 87–93, 2003.
- CARTA, A. R. et al. L-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? **European Journal of Neuroscience**, v. 45, n. 1, p. 73–91, 2017.
- CARTA, M.; TRONCI, E. Serotonin system implication in L-DOPA-induced dyskinesia: From animal models to clinical investigations. **Frontiers in Neurology**, v. 5, p. 78, 2014.
- CASTAÑO, A. et al. Lipopolysaccharide Intraneural Injection Induces Inflammatory Reaction and

Damage in Nigrostriatal Dopaminergic System. **Journal of Neurochemistry**, v. 70, n. 4, p. 1584–1592, 2002.

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

CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M. Utility of 6-hydroxydopamine lesioned rats in the preclinical screening of novel treatments for parkinson disease. In: **Movement Disorders**, p. 193–208. 2005.

CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M. Ratings of L -DOPA-Induced Dyskinesia in the Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson's Disease in Rats and Mice . **Current Protocols in Neuroscience**, v. 41, n. 1, 2007.

CHAO, C. C. et al. Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism. **Glia**, v. 16, n. 3, p. 276–284, 1996.

CHASE, T. N.; BIBBIANI, F.; OH, J. D. Striatal glutamatergic mechanisms and extrapyramidal movement disorders. **Neurotoxicity Research**, v. 5, n. 1–2, p. 139–145, 2003.

CHEN, P. S. et al. Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. **Molecular Psychiatry**, v. 11, n. 12, p. 1116–1125, 2006.

CHUNG, Y. C.; KIM, S. R.; JIN, B. K. Experimental Model of Parkinson's Disease Inflammation and Oxidative Stress in an Dopaminergic Neurons by Inhibiting Brain Paroxetine Prevents Loss of Nigrostriatal. **J Immunol**, v. 185, p. 1230–1237, 2010.

CICCHETTI, F. et al. Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 6, p. 991–998, 2002.

CRNIC, L. S.; SEGALL, M. A. Behavioral effects of mouse interferons- α and - γ and human interferon- α in mice. **Brain Research**, v. 590, n. 1–2, p. 277–284, 1992.

CZŁONKOWSKA, A. et al. Microglial reaction in MPTP (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine) induced Parkinson's disease mice model. **Neurodegeneration**, v. 5, n. 2, p. 137–143, 1996.

DAMIER, P. et al. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 1993.

DARMOPIL, S. et al. Tyrosine hydroxylase cells appearing in the mouse striatum after dopamine denervation are likely to be projection neurones regulated by L-DOPA. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 3, p. 580–592, 2008.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 2003.

DE SIMONE, R.; LEVI, G.; ALOISI, F. Interferon γ gene expression in rat central nervous system glial cells. **Cytokine**, v. 10, n. 6, p. 418–422, 1998.

DEL-BEL, E. et al. L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key elements? **Synapse**, v. 70, n. 12, p. 479–500, 2016.

DELGADO, M. Inhibition of Interferon (IFN)-induced Jak-STAT1 Activation in Microglia by Vasoactive Intestinal Peptide Inhibitory Effect On Cd40, IFN-Induced Protein-10, And Inducible Nitric-Oxide Synthase Expression. **ASBMB**, 2003.

- DEXTER, D.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 132-144, 2013.
- DI MONTE, D. A. et al. Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. **Movement Disorders**, v. 15, n. 3, p. 459-466, 2000.
- DING, X. et al. Silencing IFN- γ Binding/Signaling in Astrocytes versus Microglia Leads to Opposite Effects on Central Nervous System Autoimmunity. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 9, p. 4251-4264, 2015.
- DOBBS, R. J. et al. Association of circulating TNF- α and IL-6 with ageing and parkinsonism. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 100, n. 1, p. 34-41, 1999.
- DOHERTY, G. H. Nitric oxide in neurodegeneration: Potential benefits of non-steroidal anti-inflammatories. **Neuroscience Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 366-382, 2011.
- DOS-SANTOS-PEREIRA, M. et al. Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: Possible mechanism of action. **Neurobiology of Disease**, v. 94, p. 179-195, 2016.
- ENGELN, M. et al. Selective inactivation of striatal FosB/ Δ FosB-expressing neurons alleviates L-DOPA-induced dyskinesia. **Biological psychiatry**, v. 79, n. 5, p. 354-361, 2016.
- ESPADAS, I. et al. L-DOPA-induced increase in TH-immunoreactive striatal neurons in parkinsonian mice: Insights into regulation and function. **Neurobiology of Disease**, v. 48, n. 3, p. 271-281, 2012.
- FÄRBER, K.; PANNASCH, U.; KETTENMANN, H. Dopamine and noradrenaline control distinct functions in rodent microglial cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, n. 1, p. 128-138, 2005.
- FEINSTEIN, D. L. et al. Nitric Oxide Synthase Expression in Glial Cells: Suppression by Tyrosine Kinase Inhibitors. **Journal of Neurochemistry**, v. 62, n. 2, p. 811-814, 1994.
- FLOOD, P. M. et al. Transcriptional factor NF- κ b as a target for therapy in Parkinson's disease. **Parkinson's Disease** v. 2011, 2011.
- FONTAINHAS, A. et al. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **PloS one**, v. 6, n. 1, 2011.
- FRANKLIN, K.; PAXINOS, G. **The mouse brain in stereotaxic coordinates**. 2008.
- GAO, H. M. et al. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 81, n. 6, p. 1285-1297, 2002.
- GHASEMI, M.; FATEMI, A. Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 45, p. 168-182, 2014
- GIOCANTI-AUREGAN, A. et al. Altered astrocyte morphology and vascular development in dystrophin-Dp71-null mice. **GLIA**, v. 64, n. 5, p. 716-729, 2016.
- GUBELLINI, P.; KACHIDIAN, P. Animal models of Parkinson's disease: An updated overview. **Revue neurologique**, v. 171, n. 11, p. 750-761, 2015.
- HANISCH, U. K. Functional diversity of microglia - How heterogeneous are they to begin with?. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 65, 2013
- HASHIOKA, S. et al. Differential expression of interferon- γ receptor on human glial cells in vivo and in vitro. **Journal of Neuroimmunology**, v. 225, n. 1-2, p. 91-99, 2010.

- HASHIOKA, S. et al. Interferon- γ -Induced Neurotoxicity of Human Astrocytes. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 14, n. 2, p. 251–256, 2015.
- HAUSER, R. A. et al. Ten-year follow-up of Parkinson's disease patients randomized to initial therapy with ropinirole or levodopa. **Movement Disorders**, v. 22, n. 16, p. 2409–2417, 2007.
- HE, Y. et al. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. **Brain research**, v. 909, n. 1-2, p. 187-193, 2001.
- HELMUT, K. et al. Physiology of microglia. **Physiological Reviews**, v. 91, n. 2, p. 461–553, 2011.
- HERNANDES, M. S. et al. Microglial Cells Are Involved in the Susceptibility of NADPH Oxidase Knockout Mice to 6-Hydroxy-Dopamine-Induced Neurodegeneration. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.
- HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection?. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 4, p. 382-397, 2009.
- HIRSCH, E. C.; JENNER, P.; PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 24-30, 2013.
- HUA, L. L. et al. Modulation of astrocyte inducible nitric oxide synthase and cytokine expression by interferon β is associated with induction and inhibition of interferon γ -activated sequence binding activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 83, n. 5, p. 1120–1128, 2002.
- HUNOT, S. et al. Nitric oxide synthase and neuronal vulnerability in Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 355–363, 1996.
- HUNOT, S. et al. Nuclear translocation of NF- κ b is increased in dopaminergic neurons of patients with Parkinson disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 14, p. 7531–7536, 1997.
- IMAMURA, K. et al. Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. **Acta Neuropathologica**, v. 106, n. 6, p. 518–526, 2003.
- IVERSEN, S. D.; IVERSEN, L. L. Dopamine: 50 years in perspective. **Trends in Neurosciences**, v. 30, n. 5, p. 188-193, 2007.
- JACKSON-LEWIS, V. et al. Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 5, p. 1763-1771, 2002.
- JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of neurology, neurosurgery & psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368-376, 2008.
- JENNER, P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 9, p. 665-677, 2008
- KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, 2015.
- KAMPEN, J. Van; STOESSL, A. Effects of oligonucleotide antisense to dopamine D3 receptor mRNA in a rodent model of behavioural sensitization to levodopa. **Neuroscience**, v. 116, n. 1, p. 307-314, 2003.
- KANNARKAT, G. T.; BOSS, J. M.; TANSEY, M. G. The Role of Innate and Adaptive Immunity in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 3, p. 493–514, 2013.
- KAWANOKUCHI, J. et al. Production of interferon- γ by microglia. **Multiple Sclerosis**, v. 12, n. 5, p. 558–564, 2006..

- KEBER, U. et al. Striatal tyrosine hydroxylase-positive neurons are associated with l-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Neuroscience**, v. 298, p. 302–317, 2015.
- KLIETZ, M. et al. l-DOPA-induced dyskinesia is associated with a deficient numerical downregulation of striatal tyrosine hydroxylase mRNA-expressing neurons. **Neuroscience**, v. 331, p. 120-133, 2016.
- KNOTT, C.; STERN, G.; WILKIN, G. P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 724–739, 2000.
- KOHUTNICKA, M. et al. Microglial and astrocytic involvement in a murine model of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP). **Immunopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 167-180, 1998.
- KORTEKAAS, R. et al. Blood-brain barrier dysfunction in Parkinsonian midbrain in vivo. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 2, p. 176–179, 2005.
- KRASHIA, P. et al. Blunting neuroinflammation with resolvin D1 prevents early pathology in a rat model of Parkinson's disease. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- KUMARI, R.; KUMAR, J. B. S.; LUTHRA, P. M. Post-lesion administration of 7-NI attenuated motor and non-motor deficits in 6-OHDA induced bilaterally lesioned female rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 589, p. 191–195, 2015.
- KUSTOVA, Y. et al. The influence of a targeted deletion of the IFN γ gene on emotional behaviors. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 12, n. 4, p. 308–324, 1998.
- LAVIN, Y. et al. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1312-1326, 2014.
- LAWSON, L. et al. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-170, 1990.
- LEE, J. et al. Neuronal damage and gliosis in the somatosensory cortex induced by various durations of transient cerebral ischemia in gerbils. **Brain research**, v. 1510, p. 78-88, 2013.
- BUSCETI, C. et al. Lack or Inhibition of Dopaminergic Stimulation Induces a Development Increase of Striatal Tyrosine Hydroxylase-Positive Interneurons. **PloS one**, v. 7, n. 9, 2012.
- LEWITT, P. A. Levodopa therapy for Parkinson's disease: Pharmacokinetics and pharmacodynamics. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 64–72, 2015.
- LIANG, Y. et al. Neuroprotective Effect of Echinacoside in Subacute Mouse Model of Parkinson's Disease. **BioMed Research International**, v. 2019, 2019.
- LIN, L. F. H. et al. GDNF: A glial cell line - Derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**, v. 260, n. 5111, p. 1130–1132, 1993.
- LINDGREN, H.; Dyskinesia—Advances in the Understanding of Pathophysiology and Possible Treatment Options. **European Neurological Review**, v. 5, n. 2, p. 34-40, 2010.
- LING, Z. et al. Progressive dopamine neuron loss following supra-nigral lipopolysaccharide (LPS) infusion into rats exposed to LPS prenatally. **Experimental Neurology**, v. 199, n. 2, p. 499–512, 2006.
- LING, Z. D. et al. In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. **Movement Disorders**, v. 17, n. 1, p. 116–124, 2002.

LITTELJOHN, D. et al. Interferon- γ deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. **Neuroscience**, v. 164, n. 4, p. 1894–1906, 2009a.

LUCHTMAN, D. W.; SHAO, D.; SONG, C. Behavior, neurotransmitters and inflammation in three regimens of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Physiology and Behavior**, v. 98, n. 1–2, p. 130–138, 2009.

LUEPTOW, L. M. Novel Object Recognition Test for the Investigation of Learning and Memory in Mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 126, 2017.

LUNDBLAD, M. et al. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 120–132, 2002.

LUNDBLAD, M.; PICCONI, B.; CENCI, M. A. A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function **Neurobiology of Disease**, v. 16, n. 1, p. 110-123, 2004.

MACHADO-FILHO, J. A. et al. Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. **Behavioural Brain Research**, v. 264, p. 116–125, 2014.

MAGRO, F. et al. Decreased availability of intestinal dopamine in transmural colitis may relate to inhibitory effects of interferon-gamma upon L-DOPA uptake. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 180, n. 4, p. 379–386, 2004.

MAILMAN, R.; HUANG, X.; NICHOLS, D. E. Parkinson's disease and D 1 dopamine receptors. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 2, n. 11, p. 1582-1591, 2001.

MANDER, P. et al. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. **Journal of neuroscience research**, v. 79, n. 1-2, p. 208-215, 2005

MANGANO, E. et al. Interferon- γ plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways. **Neurobiology of aging**, v. 33, n. 7, p. 1411-1426, 2012.

MANGO, D. et al. Adenosine A1 receptor stimulation reduces D1 receptor-mediated GABAergic transmission from striato-nigral terminals and attenuates L-DOPA-induced dyskinesia in dopamine-denervated mice. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 733–743, 2014.

MARRAS, C. et al. Systematic review of the risk of parkinson's disease after mild traumatic brain injury: Results of the international collaboration on mild traumatic brain injury prognosis. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 95, n. 3, p. S238-S244, 2014.

MARTINEZ, A. A. et al. Activation of PPAR gamma receptors reduces levodopa-induced dyskinesias in 6-OHDA-lesioned rats. **Neurobiology of Disease**, v. 74, p. 295–304, 2015.

MAZZELLA, L. et al. Dyskinesias predict the onset of motor response fluctuations in patients with Parkinson's disease on L-dopa monotherapy. **Parkinsonism & related disorders**, v. 11, n. 3, p. 151-155, 2005

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Glial reactions in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 23, n. 4, p. 474-483, 2008.

MEISSNER, W. et al. Increased slow oscillatory activity in substantia nigra pars reticulata triggers abnormal involuntary movements in the 6-OHDA-lesioned rat in the presence of excessive extracellular striatal dopamine. **Neurobiology of Disease**, v. 22, n. 3, p. 586–598, 2006.

- MOGI, M. et al. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neuroscience Letters**, v. 165, n. 1–2, p. 208–210, 1994.
- MOGI, M. et al. Interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor- α levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 211, n. 1, p. 13–16, 1996.
- MOGI, M. et al. Increase in level of tumor necrosis factor- α in 6-hydroxydopamine-lesioned striatum in rats is suppressed by immunosuppressant FK506. **Neuroscience Letters**, v. 289, n. 3, p. 165–168, 2000.
- MOGI, M. et al. p53 protein, interferon- γ , and NF- κ B levels are elevated in the parkinsonian brain. **Neuroscience Letters**, v. 414, n. 1, p. 94–97, 2007.
- MONTEIRO, S. et al. Absence of IFN γ promotes hippocampal plasticity and enhances cognitive performance. **Translational Psychiatry**, v. 5, n. 1, p. e707–e707, 2015.
- MORAN, L. B.; DUKE, D. C.; GRAEBER, M. B. The microglial gene regulatory network activated by interferon-gamma. **Journal of Neuroimmunology**, v. 183, n. 1–2, p. 1–6, 2007.
- MORGANTI, J. et al. Call off the dog (ma): M1/M2 polarization is concurrent following traumatic brain injury. **PloS one**, v. 11, n. 1, 2016.
- MORRISON, H. W.; FILOSA, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **Journal of Neuroinflammation**, v. 10, n. 1, p. 1–20, 2013.
- MOUNT, M. P. et al. Involvement of interferon- γ in microglial-mediated loss of dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 12, p. 3328–3337, 2007.
- MULAS, G. et al. Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous L-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 286, p. 83–92, 2016.
- NEUMANN, H. et al. Neurotrophins inhibit major histocompatibility class II inducibility of microglia: Involvement of the p75 neurotrophin receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 10, p. 5779–5784, 1998.
- NEVES, K. R. T. et al. Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2015, 2015.
- NIEOULLON, A. Dopamine and the regulation of cognition and attention. **Progress in Neurobiology**, v. 67, n. 1, p. 53–83, 2002.
- OBESO, J. A. et al. Missing pieces in the Parkinson's disease puzzle. **Nature medicine**, v. 16, n. 6, p. 653–661, 2010.
- OHLIN, K. E. et al. Vascular endothelial growth factor is upregulated by l-dopa in the parkinsonian brain: implications for the development of dyskinesia. **Brain**, v. 134, n. 8, p. 2339–2357, 2011.
- ORR, A. et al. Adenosine A2A receptor mediates microglial process retraction. **Nature neuroscience**, v. 12, n. 7, p. 872, 2009.
- ORTIZ, G. G. et al. Physiology and Pathology of Neuroimmunology: Role of Inflammation in Parkinson's Disease. In: **Physiology and Pathology of Immunology**. IntechOpen, 2017.
- PADOVAN-NETO, F. et al. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats.

Neuropharmacology, v. 89, p. 87-99, 2015

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/DeltaFosB expression. **Neuroscience Letters**, v. 541, p. 126–131, 2013.

PAVON, N. et al. ERK Phosphorylation and FosB Expression Are Associated with L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Mice. **Biological psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 64-74, 2006.

PAWATE, S. et al. Redox regulation of glial inflammatory response to lipopolysaccharide and interferon γ . **Journal of Neuroscience Research**, v. 77, n. 4, p. 540–551, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition**. Elsevier, 2006.

PEKKNY, M.; NILSSON, M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **GLIA**, v. 50, n. 4, p. 427-434, 2005.

PEKKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKKNY, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neuroscience letters**, v. 565, p. 30-38, 2014.

PHILLIPS, J. G. et al. Motor functions of the basal ganglia. **Psychological research**, v. 55, n. 2, p. 175-181, 1993

PICCONI, B. et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 501–506, 2003.

PISANU, A. et al. Neuroinflammation in L-DOPA-induced dyskinesia: beyond the immune function. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 8, p. 1287-1297, 2018.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 2017.

PONT-SUNYER, C. et al. The onset of nonmotor symptoms in parkinson's disease (the onset pd study). **Movement Disorders**, v. 30, n. 2, p. 229–237, 2015.

POPKO, B. et al. The effects of interferon- γ on the central nervous system. **Molecular Neurobiology**, v. 14, n. 1–2, p. 19–35, 1997.

RAJPUT, A. H. et al. Clinical-pathological study of levodopa complications. **Movement Disorders**, v. 17, n. 2, p. 289-296, 2002.

RAMANA, C. et al. Stat1-dependent and-independent pathways in IFN- γ -dependent signaling. **Trends in immunology**, v. 23, n. 2, p. 96-101, 2002.

RAMIREZ-GARCIA, G. et al. Nitrosative and cognitive effects of chronic L-DOPA administration in rats with intra-nigral 6-OHDA lesion. **Neuroscience**, v. 290, p. 492-508, 2015.

RANSOHOFF, Richard M. A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. **Nature neuroscience**, v. 19, n. 8, p. 987, 2016.

RENNER, N. A. et al. Transient acidification and subsequent proinflammatory cytokine stimulation of astrocytes induce distinct activation phenotypes. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 6, p. 1284–1294, 2013.

RENTSCH, P. et al. Time dependent degeneration of the nigrostriatal tract in mice with 6-OHDA lesioned medial forebrain bundle and the effect of activin A on L-Dopa induced dyskinesia. **BMC Neuroscience**, v. 20, n. 1, p. 5, 2019.

RODRIGUES, R. W. P.; GOMIDE, V. C.; CHADI, G. Astroglial and microglial reaction after a partial nigrostriatal degeneration induced by the striatal injection of different doses of 6-

- hydroxydopamine. **International Journal of Neuroscience**, v. 109, n. 1–2, p. 91–126, 2001.
- SALIM, T.; SERSHEN, C. L.; MAY, E. E. Investigating the Role of TNF- α and IFN- γ Activation on the Dynamics of iNOS Gene Expression in LPS Stimulated Macrophages. **PloS one**, v. 11, n. 6, 2016.
- SCHALLERT, T. et al. CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 5, p. 777–787, 2000.
- SCHRAG, A. et al. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: A case-control study. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 1, p. 57–64, 2015.
- SCHULTZ, W. Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 259–288, 2007.
- SCHWARTING, R.; HUSTON, J. The unilateral 6-hydroxydopamine lesion model in behavioral brain research. Analysis of functional deficits, recovery and treatments. **Progress in neurobiology**, v. 50, n. 2–3, p. 275–331, 1996.
- SEBASTIANUTTO, I. et al. Validation of an improved scale for rating L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse and effects of specific dopamine receptor antagonists. **Neurobiology of Disease**, v. 96, p. 156–170, 2016.
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 96, p. e52434, 2015.
- SHIBATA, H. et al. Lipopolysaccharide-induced dopaminergic cell death in rat midbrain slice cultures: Role of inducible nitric oxide synthase and protection by indomethacin. **Journal of Neurochemistry**, v. 86, n. 5, p. 1201–1212, 2003.
- SHIMOJI, M. et al. CXCR4 and CXCL12 expression is increased in the nigro-striatal system of Parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 16, n. 3, p. 318–328, 2009.
- SILVA, T. P. da et al. Time course study of microglial and behavioral alterations induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Neuroscience Letters**, v. 622, p. 83–87, 2016.
- SMITH, G. A. et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice II: Predicting L-DOPA-induced dyskinesia. **Behavioural Brain Research**, v. 226, n. 1, p. 281–292, 2012.
- SOFRONIEW, M. V.; VINTERS, H. V. Astrocytes: Biology and pathology. **Acta Neuropathologica**, v. 119, n. 1, p. 7–35, 2010.
- SOLÍS, O. et al. Nitric oxide synthase inhibition decreases L-DOPA-induced dyskinesia and the expression of striatal molecular markers in Pitx3-/- aphakia mice. **Neurobiology of Disease**, v. 73, p. 49–59, 2015.
- SPILLANTINI, M. et al. α -Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839–840, 1997.
- STENCE, N.; WAITE, M.; DAILEY, M. E. Dynamics of microglial activation: A confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. **GLIA**, v. 33, n. 3, p. 256–266, 2001.
- STOTT, S. R. W.; BARKER, R. A. Time course of dopamine neuron loss and glial response in the 6-OHDA striatal mouse model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 39, n. 6, p. 1042–1056, 2014.
- STYPUŁA, G. et al. Evaluation of Interleukins, ACTH, Cortisol and Prolactin Concentrations in the Blood of Patients with Parkinson's Disease. **Neuroimmunomodulation**, v. 3, n. 2–3, p. 131–134, 1996.

- SULZER, D. et al. Regulation of extracellular dopamine: release and reuptake. In: **Handbook of Behavioral Neuroscience**. Elsevier, 2010. p. 297-319
- SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 318–324, 2016.
- TANNER, C. M. et al. Rotenone, Paraquat, and Parkinson's Disease. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 6, p. 866–872, 2011.
- TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiol Dis**, v. 37, n. 3, p. 510–518, 2010.
- TANSEY, M. G.; MCCOY, M. K.; FRANK-CANNON, T. C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Experimental neurology**, v. 208, n. 1, p. 1-25, 2007.
- TARAKAD, A.; JANKOVIC, J. Diagnosis and Management of Parkinson's Disease. In: **Seminars in neurology**. Thieme Medical Publishers, 2017. p. 118-126
- TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: Co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochemistry international**, v. 62, n. 5, p. 803-819, 2013.
- TEKUMALLA, P. et al. Elevated levels of Δ FosB and RGS9 in striatum in Parkinson's disease. **Biological psychiatry**, v. 50, n. 10, p. 813-816, 2001
- THANGARAJ, A. et al. Mitigation of cocaine-mediated mitochondrial damage, defective mitophagy and microglial activation by superoxide dismutase mimetics. **Autophagy**, v. 16, n. 2, p. 289–312, 2020.
- THEODOSIS, D. T.; POULAIN, D. A.; OLIET, S. H. R. Activity-dependent structural and functional plasticity of astrocyte-neuron interactions. **Physiological Reviews**, v. 88, n. 3, p. 983-1008, 2008.
- TSUDA, M. et al. IFN- γ receptor signaling mediates spinal microglia activation driving neuropathic pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 19, p. 8032–8037, 2009.
- TYSNES, O. B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901-905, 2017.
- UNGERSTEDT, U. 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 5, n. 1, p. 107–110, 1968.
- VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 97-120, 1998.
- WAN, Y. et al. Levodopa/benserazide loaded microspheres alleviate L-dopa induced dyskinesia through preventing the over-expression of D1R/Shp-2/ERK1/2 signaling pathway in a rat model of Parkinson's Disease. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 9, n. OCT, 2017.
- WANG, X.; SUZUKI, Y. Microglia produce IFN- γ independently from T cells during acute toxoplasmosis in the brain. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 27, n. 7, p. 599–605, 2007.
- WEINBERGER, S. B. et al. Decreased locomotor activity produced by repeated, but not single, administration of murine-recombinant interferon-gamma in mice. **Life Sciences**, v. 42, n. 10, p. 1085–1090, 1988.

- WEINSTEIN, J. J. et al. Pathway-Specific Dopamine Abnormalities in Schizophrenia. **Biological psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 31–42, 2017.
- WESTIN, J. E. et al. 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**, v. 62, n. 7, p. 800–810, 2007a.
- WICHMANN, T.; BERGMAN, H.; DELONG, M. R. Basal Ganglia, Movement Disorders and Deep Brain Stimulation: Advances Made Through Non-Human Primate Research HHS Public Access. **J Neural Transm**, v. 125, n. 3, p. 419–430, 2018.
- WILHELMSSON, U. et al. Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 46, p. 17513–17518, 2006.
- WINKLER, C. et al. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease: Relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiology of Disease**, v. 10, n. 2, p. 165–186, 2002.
- XENIAS, H. S. et al. Are striatal tyrosine hydroxylase interneurons dopaminergic?. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 16, p. 6584–6599, 2015.
- XIMENES, J. C. M. et al. Valproic Acid Neuroprotection in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease Is Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and HDAC Inhibitory Properties. **Journal of Neurodegenerative Diseases**, v. 2015, p. 1–14, 2015.
- XING, B. et al. Neuroprotection with pioglitazone against LPS insult on dopaminergic neurons may be associated with its inhibition of NF- κ B and JNK activation and suppression of COX-2 activity.. **Journal of neuroimmunology**, v. 192, n. 1-2, p. 89–98, 2007.
- YOUNG, K.; MORRISON, H. Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2018, n. 136, 2018.
- YOUNG, R. C.; ERVIN, G. N.; SMITH, G. P. Abnormal open field behavior after anterolateral hypothalamic injection of 6-hydroxydopamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 5, n. 5, p. 565–570, 1976.
- ZENG, X.-S.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN neuro**, v. 10, p. 1759091418777438, 2018.
- ZHANG, Y. et al. Cellular/Molecular An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 36, p. 11929–11947, 2014.
- ZHOU, X. et al. TGF β 1 inhibits IFN γ -mediated microglia activation and protects mDA neurons from IFN γ -driven neurotoxicity. **Journal of Neurochemistry**, v. 134, n. 1, p. 125–134, 2015.

Relatório final do estágio em pesquisa no exterior

Título: Role of the SK3 channel in neuroinflammatory mechanisms of L-DOPA induced-dyskinesia and Parkinson's disease

Relatório final apresentado à FAPESP pela Bolsa de Estágio em Pesquisa no Exterior (BEPE) no período de Novembro de 2018 a Maio de 2019, no Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin de Göttingen, Alemanha.

Orientador: Prof. Dr. Walter Stühmer

Colaboradora: Dra. Sabine Martin

Introduction and Background

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disorder characterized by loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra compacta (SNc) and their terminals in the striatum (Albin et al, 1989). The reduction of dopamine (DA) levels in the striatum results in classic PD motor symptoms: bradykinesia, rigidity and tremor (Dauer & Przedborski, 2003). It is not clear the causes of the degeneration in dopaminergic neurons, but other factors such as oxidative stress, mitochondrial dysfunction, apoptosis, formation of Lewy bodies and inflammation have been identified and are hypothesized to play a role in the pathogenesis of PD (Bi et al., 2013; Kaur et al, 2017; Olanow, 2007; Zhang et al, 2017).

Postmortem analyses of PD patient's brain have indicated inflammation as a key component in PD. These analyses showed in areas where degeneration was evident high levels of pro-inflammatory cytokines, such as interleukin $IL-1\beta$, tumor necrosis factor- α (TNF- α ; Mogi et al 1994; Hirsch et al 1998) and interferon- γ (IFN- γ ; Mogi et al, 2007). Furthermore, MPTP-treated monkeys presented elevated levels of IFN- γ and microglia activation, correlated to dopaminergic neuronal death in the Substantia nigra pars compacta (SNc; Barcia et al, 2011). Also, activation of astrocytes and microglia initiates the releasing of cytotoxic factors in the inflammation-mediated pathogenesis in a 6-OHDA-induced PD rat model (Marinova-Mutafchieva et al, 2009). Thus, these evidences suggest the contribution to inflammatory mechanisms in the cascade of events leading to neurodegeneration in PD (Hirsch and Hunot, 2009).

L-DOPA, the metabolic precursor of DA, is a well-established treatment for the motor deficits of PD (Reich & Savitt, 2018). However, it causes long-term complications called L-DOPA induced-dyskinesia (LID) that is characterized by abnormal involuntary movements (AIMs). It was postulated that LID is a result from fluctuations in the central levels of DA, causing aberrant plasticity in dopaminoceptive brain structures, as striatum (reviewed in Carta et al., 2008; Cenci and Konradi, 2010). Accordingly, the excessive levels of DA in the striatal extracellular fluid after administration of L-DOPA could favor the development of a pro-inflammatory environment in the striatum (Del-Bel et al., 2016). In accordance to this, increased microglia and astrocytes activation and expression of inducible nitric oxide-synthase (iNOS) were found in hemiparkinsonian dyskinetic rats (Bortolanza et al, 2015a). But it is still unknown exactly what triggers the microglial activation in PD and LID.

In healthy brain, microglia displays a resting state, characterized by ramified morphology and low expression of surface receptors that mediate their normal macrophage

function. However, in response to neuronal injury or infection, microglia rapidly became activated, acquiring an amoeboid form (Wojtera et al., 2005). The prolonged activated state of microglia could lead to overproduction of several pro-inflammatory cytokines (for example, IL-1 β , IL-6, and TNF- α) and nitric oxide (NO) that is detrimental to neurons (reviewed by Taylor et al., 2013). In this way, it is necessary to investigate a pathway of microglia activation in the pathophysiology of PD or LID. Intracellular calcium [Ca²⁺]_i can act as a central element in microglia activation (Hoffmann et al., 2003). Microglia responds to central nervous system (CNS) damage (as neuronal death) by up-regulating functions that involve Ca²⁺ signaling, such as the production of NO and cytokines (Farber & Kettenmann, 2006). An immediate response to a rise in intracellular Ca²⁺ is the activation of small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (K_{Ca}2.1–2.3, SK channels; Kohler et al, 1996; Stocker, 2004).

SK channels are voltage-independent widely disseminated in CNS and peripheral tissues (Kohler et al, 1996). In rodents, the type 3 (SK3) channels are abundant in the SNc (Sailer et al, 2004; Dror et al., 1999) and in the striatum (Eder, 2010; Schlichter et al, 2010; Khanna et al, 2001). They contribute to the after hyperpolarization occurring following an action potential, becoming a key regulation of neuronal excitability and firing patterns and also neurotransmitter release (Farber, 2009; Pedarzani & Stocker, 2008).

More recently, it was found that SK3 can also contribute to microglia-mediated neurotoxicity through activation of p38-MAPK but not NF- κ B (Schlichter et al, 2010). It was found selectively increase of SK3 immunoreactivity in microglia activated by LPS, along with increased iCa²⁺ (Hoffman et al, 2003; Schlichter et al, 2010). Other studies have observed that blocking SK3 channels inhibits LPS-induced classical activation of microglia and consequently reduces activation of p38-MAPK and production of superoxide and nitric oxide, thereby reducing microglia neurotoxic ability but does not globally inhibiting their function (Kahanna et al, 2001; Schlichter et al, 2010, Kaushal et al, 2007). Studies using bee venom, a specific blocker of SK2 and SK3 channels, showed in mice neuroprotective effect against MPTP-induced of DA cells loss in SNc (Alvarez-Fischer et al, 2013; Doo et al, 2010) and akinesia and catalepsy induced by 6-OHDA lesion in rats (Maurice et al, 2015). Apparently both toxins have the potential to repress inflammatory processes mediated by microglial cells (Kim et al, 2011; Han et al, 2007).

The effect of SK3 channel enhancement or deletion in PD and LID is not known. Knowing that L-DOPA long-term treatment induces microglial activation and release cytotoxic factors and that SK3 channels potentiate microglial activation which, in turn,

contributes to cytokine induction (Hoffmann et al., 2003), we hypothesize that these channels are part of a pathway enrolled on L-DOPA-induced microglial activation on LID.

Aims of the Investigation The **general aim** of this work was to evaluate the role of SK3 channels in neurodegenerative and inflammatory responses in mice model of PD and LID. The **specific aim** consisted in evaluate in wild type, SK3 overexpressing (SK3-T/T) and SK3 knock-out (SK3/KO) mice through evaluation of: 1- depressive-like behavior by tail suspension test and spontaneous locomotor activity by open field test; 2-the forelimb use asymmetry after injection of 6-OHDA by cylinder test; 3-the development of dyskinesia by treatment with L-DOPA; 4-the extension of the DA degeneration at the striatum and SNc and microglia activation at striatum.

Methodology

Animals Male adult mice (12-19 months old), wild type, SK3-T/T and SK3/KO generated at animal facilities of the Max Planck Institute for Experimental Medicine (MPI, Göttingen-Germany), from heterozygous breeding pairs backcrossed for several generations to C57BL/6 strain, weighting 25g, will be housed under a 12-h light/dark cycle with free access to food and water.

Genotyping Ear biopsies were taken of mice in the age of three to four weeks. Animals returned to their home cage immediately after completion of sampling. The samples were stored in -20°C freezer. The DNA extraction was made using 300ul lysis buffer and Proteinase K (20mg/ml). After 2 hours incubating at 55°C under 900 rpm shaking, the samples were centrifuged and the supernatant transferred to a new tube. It was added 300ul of isopropanol and centrifuged again. The samples were washed 2x with 80% EtOH, the pellet of DNA resuspended in 100 H₂O and stored at -20°C. Genotyping was carried out using standard PCR protocols. The following primers were used: SK3 T/T F 5'-CTTGCCATATAACAGTGTCTAG-3' and R 5'-CAACAGCTGGCCCTCGCAGACAG-3'; SK3 KO, F 5'-CTTGCCATATAACAGTGTCTAG-3' and R 5'-GTATCGGTGACTGCTTCATCC-3' and SK3 WT R 5'-CCAGAAGATGGACAGGGACAC-3'. PCR was performed with an initial denaturation of 2' at 96°C followed by 30 cycles of 30'' at 96°C, 45'' at 58° and 1' at 72°C, with a final extension of 10' at 72°C. The products of amplification were subjected to electrophoresis on a 1.4% agarose gel that contained 6.7 ul of gel red, in TBE buffer, and were visualized by a transilluminator to evaluate the bands (SK3 WT: 400pb; SK3 T/T: 300bp; SK3 KO: 550pb).

Drugs 6-Hydroxydopamine (6-OHDA; 2,4,5-Trihydroxyphenethylamine hydrochloride), 3.75 mg/ml diluted in saline 0.9% containing 0.02% ascorbic acid; L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine methyl ester hydrochloride) 25 mg/kg i.p. diluted in saline 0.9%; benserazide (DL-Serine 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl)-hydrazide hydrochloride), 10 mg/kg i.p. diluted in saline 0.9%.

6-Hydroxydopamine Lesion The 6-OHDA-induced lesion was based on a previous study by Pavón et al. (2006). Animals were anesthetized with ketamine (60mg) and xylazine (10 mg/kg i.p.) and fixed into the stereotaxic apparatus for performing the surgery (David Kopf, model USA, 9:57). Stereotaxic coordinates in the dorsolateral region of striatum were (in mm from Bregma): anteroposterior (AP) = +0.5; lateral-lateral (LL) = -2.3 and dorsoventral (DV) = -3.9 and -3.0 (Paxinos & Watson, 2007). 6-OHDA was microinjected with a total volume of 2 µl/injection (2 injection places; 1µL/min). After the microinjection, the cannula was left in place for five additional minutes to prevent reflux of the injected solution. At the end of the surgical procedure, the animals were kept warm by a 60 W light bulb until full recovery from anesthesia and then led to the vivarium.

Cylinder test The cylinder test was described by Schallert et al (2000). It evaluates the limb-use asymmetry. The mice were placed in a transparent cylinder and were count the number of spontaneous contacts of the left and right forelimb with the cylinder wall for 5 minutes. Each behavior is expressed as a percentage. It is expected the lesioned mice use fewer the paw contralateral to the lesion.

L-DOPA-Induced Abnormal Involuntary Movements Mice were monitored for AIMs using a mice dyskinesia scale (Lundblad et al.2002; Winkler et al.2002; Cenci et al. 1998). Briefly, three weeks after 6-OHDA injection, mice were subjected to a chronic L-DOPA administration for 21 days to induce a stable expression of dyskinesia. Axial, limb, and orolingual AIMs subtypes were scored during 1-min periods every 20 min for a total of 180 min post- L-DOPA administration (Padovan-Neto et al. 2009). Each of these four subtypes were scored according to severity scale ranging from 0 to 4 (where 0 = absent, 1 = occasional, 2 = frequent, 3 = continuous but interrupted by sensory distraction, and 4 = continuous, severe and not suppressible). This scale considers the percentage of observation time a dyskinetic movement is expressed.

Histological procedures Under anesthesia (as described in dos-Santos-Pereira et al, 2016), animals were perfused transcardiac with an appropriate volume of 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.12 m phosphate buffer (PB), pH 7.2–7.4. Brains were removed, stored overnight in the same fixative at 4°C, washed in PBS, and finally cryoprotected in 30% sucrose in 0.12 m

PB. After that, the brains were frozen at -40°C in isopentane and stored in a freezer at -80°C until histological processing. 25 μm -thick brain sections were serially cut in the coronal plane with a Leica cryostat (Model RM2165), and brain sections through the striatum and SNc were collected with PBS.

Immunofluorescence For immunolabeling, sections were washed three times with PBS, then were incubated overnight at room temperature with the appropriated primary antibodies dissolved in PBS with 2% donkey or goat serum (Jackson ImmunoResearch) and 0.25% Triton X-100 (Sigma-Aldrich): anti-tyrosine hydroxylase (1:1000; US Biological, EUA), anti-IBA-1 (1:5000, Abcam, UK), and anti-SK3 (1:100, Alomone Labs, Israel). Sections were then exposed for 2 h at room temperature to Alexa Fluor fluorescent secondary species-specific antibodies and DAPI for nuclei staining. The slices were mounted on slides and cover slipped for microscopic observations.

Image Analysis After performing the immunostaining reaction, the neuroanatomical sites were identified according to The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates (Paxinos & Franklin, 2007). The TH-, Iba-1- and SK3-positive labeling in the dorsolateral striatum and SNc were captured using a 20x objective on an Axiovert 200 M Zeiss microscope connected to an image analysis system (Axiocam-Axio Vision 4.6.3 SP1) from rostral to caudal and quantified as previous described (Lazzarini et al. 2013). Briefly, by using Image J software, the image analyzer reads O.D. as gray levels. Background was removed by subtracting values obtained from regions where no staining was observed.

Experimental design WT, SK3/KO and SK3-T/T mice received unilateral injection of 6-OHDA to induce nigrostriatal DA degeneration, and after 21 days they were evaluated for forelimb use asymmetry at the cylinder test. Then the animals were treated with saline or L-DOPA for 14 days and evaluated for dyskinesia. All the animals were sacrificed, and the brains removed for immunohistochemistry analyses in the striatum and SNc.

Statistical analysis Data were analyzed for normality and homogeneity of variance. Statistical differenced was accessed by ANOVA tests, followed by Post-hoc tests. P values were set as $p < 0.05$.

Results

Behavior characterization of SK3 channel overexpressed and knock-out mice

To evaluate depressive-like behavior, we performed Tail Suspension test in SK3-KO, SK3 T/T and, WT mice (Figure 1). Both the absence and the overexpression of SK3 channels appeared to decreased immobility time compared to WT ($F(2, 27) = 43.39$; $p < 0.01$). Also,

SK3-T/T mice presented even less immobility time when compared to SK3-KO group ($p<0.01$).

Figure 1. Evaluation of depression-like behavior in SK3-KO and SK3-T/T mice at tail suspension test. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. * $p<0.01$ compared to respective WT group. # $p<0.01$ compared to respective KO group. $n=9-11$.

To compare the spontaneous locomotor activity in SK3-KO and SK3-T/T mice we performed open field test (Figure 2). The SK3-KO showed increased distance travelled at the apparatus and the SK3-T/T decreased ($F [2, 25] = 7.01$; $p<0.01$). Mice SK3-KO showed less immobility ($F [2, 26] = 3.11$; $p<0.05$) and freezing time ($F [2, 28] = 3.632$; $p<0.05$). SK3-T/T mice had decreased average of speed compared to KO group ($F [2, 29] = 2.793$; $p<0.1$). There is no differences at latency to the first center exit ($F [2, 28] = 2.124$; $p>0.1$) and number of rotations ($F [2, 28] = 0.9064$; $p>0.1$).

Figure 2. Evaluation of spontaneous locomotor activity in SK3-KO and SK3-T/T mice at open field test. (A) Distance travelled (B) Total immobility time (C) Total freezing time (D) Latency to the first exit the center (E) Average of speed (F) Number of rotations. One-way ANOVA. * $p < 0.01$ compared to WT group. # $p < 0.01$ compared to KO group. & $p < 0.1$ compared to WT. $n = 11$.

Behavior assessment on dopaminergic loss and on L-DOPA induced dyskinesia

The SK3-KO and SK3-T/T mice received microinjections of 6-OHDA into right dorsolateral striatum to induce degeneration of dopaminergic neurons. After 21 days of surgery, they were exposed to cylinder test to evaluate locomotor asymmetry caused by the neurotoxin (Figure 3). All three genotypes showed a reduction on the use of the paw contralateral to the lesion side, indicating motor deficit ($F [1, 62] = 96.53$; $p < 0.01$).

Figure 3. Evaluation of forelimb use by the cylinder test after microinjection of 6-OHDA into right striatum. There was a significant decrease on the left forelimb use in all genotypes. No differences were found between the groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.01$ vs ipsilateral limb. $n = 8-14$.

After the cylinder test, we started L-DOPA treatment (25mg/kg) for 14 days. We evaluated abnormal involuntary movements (AIMs) at the 1st, 7th, and 14th day of the treatment (Figure 4). Both SK3-KO and WT mice developed dyskinetic movements since the first day of L-DOPA and, the dyskinetic levels were established at the 14th day. The SK3-T/T mice did not develop dyskinesia at any point of the treatment. At the 14th it was given another higher dose (50mg/kg) of L-DOPA for the SK3-T/T group and, they still did not show any dyskinetic movements (data not shown).

Figure 4. Evaluation of Axial, Limb and Orofacial (ALO) AIMs after 14 days of L-DOPA treatment in lesioned mice. Both SK3-KO and WT mice showed dyskinetic behavior since the first day of the treatment. The SK3-T/T group did not presented any changes after L-DOPA treatment. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison test.* $p < 0.01$ compared to WT group. $n = 5-8$.

Evaluation of the dopaminergic loss in striatum and substantia nigra compacta

At the 15th day of L-DOPA treatment, mice were sacrificed and, brains were removed to perform immunofluorescent analysis. To confirm the 6-OHDA-induced lesion, we evaluate immunostaining of the enzyme tyrosine hydroxylase (TH) on striatum and SNc.

In the SK3-KO group, 13 mice received injection of 6-OHDA and, 54% of the mice developed lesion and DA depletion in the striatum and SNc. In SK3-T/T, 14 mice were injected and, only 43% of the mice developed lesion. In the WT group, from 14 operated mice, 72% developed lesion. The following results refer only to the lesioned mice.

On the dorsolateral portion of striatum (Figure 5 A-C), compared to contralateral hemisphere, we observed decreased on optical density of DA fibers on the lesioned side, at medial ($F [1, 34] = 51,17; p < 0.01$) and caudal ($F [1, 38] = 40,95; p < 0.01$) levels in all groups. The mean dopaminergic depletion was 48% in medial sections and 55% in caudal sections and no differences were found between SK3-KO, SK3-T/T and WT mice on the ipsilateral side in any level (Medial $F [2, 18] = 2.153; p = 0,1451$; Caudal $F [2, 19] = 1,246; p = 0,3101$).

On the ventrolateral portion of striatum (Figure 5A'-C'), compared to contralateral hemisphere, we also observed decreased on optical density of DA fibers on the lesioned side, at medial ($F [1, 32] = 32,5; p < 0.01$) and caudal ($F [1, 36] = 41,08; p < 0.01$) levels in all groups. The mean dopaminergic depletion was 31% in medial sections, and 42% in caudal sections and no differences were found between SK3-KO, SK3-T/T and WT mice on the ipsilateral side in any level (Medial $F [2, 16] = 1,289; p = 0,3027$; Caudal $F [2, 18] = 1,127; p = 0,3457$). In rostral sections we did not observe any reduction on DA fibers, compared to unlesioned side.

Figure 5. Evaluation of Immunofluorescence TH staining in dopaminergic fibers in striatum by optical density after 6-OHDA lesion on ipsilateral hemisphere. Evaluation in the rostro-caudal extension of striatum showed in all three genotypes similar decreased in TH staining in right hemisphere. No differences were found between the groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. * $p < 0.05$ compared to respective ipsilateral side. $n = 5-10$.

In the SNc, compared to contralateral side, we observed reduction on DA neurons after injection of 6-OHDA on rostral ($F [1, 35] = 48,76$; $p < 0,01$) medial ($F [1, 32] = 42,21$; $p < 0,01$) sections levels in all three genotypes (Figure 7). The mean DA depletion in SNc was 47% for rostral sections and 45 % for medial sections. On caudal sections, we only observed significant reduction of DA neurons in WT group of 43% ($F [1, 37] = 17,89$; $p = 0,01$).

No differences on the intensity of the lesion were found between WT, SK3-KO and SK3-T/T in any level (Rostral $F [2, 17] = 0,6144$; $p = 0,5525$; Medial $F [2, 15] = 1,526$; $p = 0,2492$; Caudal $F [2, 18] = 0,3017$; $p = 0,7432$).

Figure 6. Evaluation of Immunofluorescence TH staining in dopaminergic neurons in SNc by optical density after 6-OHDA lesion on right striatum. Evaluation in the rostro-caudal extension of SNc showed in all three genotypes similar decreased in TH neurons staining in ipsilateral side. In caudal level, only in WT group there is significant difference on the lesion. No differences were found between the groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. * $p<0.05$ compared to respective ipsilateral side. $n=6-8$.

Evaluation of microglial activation after 6-OHDA-induced lesion and L-DOPA treatment

We evaluated IBA-1 staining as an indicator of microglia expression. Upon signs of damage at the CNS, the morphological state of microglial cells change to an activated state characterized by swollen ramified cells with a larger cell body (Davis et al, 2017). The number of activated microglia versus resting microglia was counted.

We observed increased microglia activation (Figure 9) in the lesioned hemisphere, compared to contralateral side, in medial (dorsolateral $F(1, 35) = 55.86$; $p<0.01$; ventrolateral $F(1, 32) = 36.45$; $p<0.01$) and caudal sections (dorsolateral $F(1, 36) = 18.09$; $p<0.01$; ventrolateral $F(1, 36) = 21.6$; $p<0.01$). No differences were found in the activation of

microglia in the lesioned striatum between the groups. The exception was dorsolateral medial region, where we found SK3-T/T group has less activated microglia than the SK3-KO group ($p=0.0366$). Since we observed significantly decreased of TH+ staining only in the medial and caudal section of the striatum, the IBA-1 staining was not evaluated in striatal rostral sections.

Figure 7. Analysis of IBA-1 immunostaining for activated microglia cells on lesioned and contralateral striatum after 14 days of L-DOPA treatment. In all three genotypes there was a significant increase in number of activated microglia on lesioned hemisphere. No differences were found between the groups. Data are presented as mean $\pm$ SEM. Two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. * $p<0.05$ compared to respective ipsilateral side. $n=5-10$.

Discussion

In the present study, we investigated the influence of SK3 channels in the neurodegeneration induced by the neurotoxin 6-OHDA in striatum and SNc, in the development of LID and microglia activation in mice model of PD and LID. Here we showed that both SK3-T/T mice and SK3-KO mice had the same extent of the lesion in striatum and SNc as WT mice. Surprisingly, after 14 days of L-DOPA treatment, only WT and KO group developed dyskinesia, whereas the SK3-T/T did not present any sign of dyskinetic movements.

Previously to the stereotaxic surgery, we performed behavioral tests in SK3-T/T and SK3-KO mice in order to characterize the role of SK3 channels in depressive-like behavior and locomotor function. The tail suspension test is widely used in assessing the emotional phenotype of mice and in screening for pharmacological antidepressant-like potential treatment (Can et al, 2012). As previously reported in the literature, the SK3 deficiency resulted in decreased immobility time at the tail-suspension test (Cryan & Slattery, 2007; Jacobsen et al, 2008). The channel inhibition has anti-depressant like phenotype and this effect might be likely to an increased DA and 5-HT neuronal activity (Jacobsen et al, 2008). Unexpectedly, the SK3 overexpression also had reduced the immobility time, in a superior

way than the KO group and this result has not been reported yet. The spontaneous locomotor activity was explored by the open field test and we did not find any differences between overexpressed SK3 and WT at the open field, as found by Grube et al (2011). On the other hand, we demonstrated that SK3-KO mice has increased distance travelled and reduced immobility and freezing time when compared to WT and T/T group. Similar results were found by Jacobsen and colleagues (2008) where male SK3-deficient mice display altered locomotor behaviors in the open field compared with WT. Thus, as SK3 channel are important regulator of DA neuronal excitability (Wolfart et al, 2001) they could impact on behaviors related to monoaminergic function, such as depression, anxiety and locomotor behaviors.

The mice in this study received unilateral injection of 6-OHDA at the striatum. This toxin-induced model in the rodents has been used widely because it produces side-biased motor impairments that reflect the motor deficits seen in PD and degeneration of DA neurons of the nigrostriatal pathway (Bagga et al, 2015). A preliminary evaluation of the 6-OHDA effect on SK3-T/T and SK3-KO mice was made by the cylinder test after 21 days of surgery. The cylinder test is a highly sensitive assay to detect significant behavioral impairment in the 6-OHDA mouse model (Glajch et al, 2012). As an indicator of successful lesion, all groups of mice showed strong asymmetry on the use of the forelimb paw, similar as previous studies (Boix et al, 2015; Iancu et al, 2005).

Immunofluorescent analysis of TH⁺ staining in striatum and SNc confirmed the degeneration of dopaminergic fibers and DA neurons. Interestingly, no differences of the extent of the lesion were found between the groups, indicating that the SK3 channels had no impact on the behavioral and molecular effects of 6-OHDA injected in the striatum. These effects had never been investigated on overexpressing SK3 or knock-out mice before. However, previous studies using pharmacological tools as the blockade of SK channels with apamin or bee venom and positive modulator of these channels as 1-EBIO or NS309 have found conflicting results on the DA neuroprotection. In one side the treatment with bee venom is reported to prevent the loss of TH immunoreactivity in the striatum and SN and improvement of motor performance in both MPTP and 6-OHDA lesion mouse model of PD (Doo et al, 2010; Maurice et al, 2015; Alvarez-Fischer, 2013), also inhibiting microglial activation and iNOS expression (Kim et al, 2011). The dopaminergic neuroprotective effect of bee venom treatment could be mainly by anti-inflammatory reactions via the suppression of pro-inflammatory factors such as COX-2, phospholipase A2, TNF- α , IL-1, IL-6, iNOS and oxidative-stress-induced ROS production (Park et al, 2004; 2007; Son et al, 2007). On the

other hand, the activation of SK channel by its agonist 1-EBIO attenuates 6-OHDA-induced DAergic neuronal firing irregularity and the subsequent neuronal death (Wang et al, 2015). NS309 (a derivative of 1-EBIO) provided neuroprotection to human DA neurons against rotenone-induced toxicity (Dolga et al, 2014), suggesting that increasing SK activity could be a therapeutic strategy for neuroprotection. Besides that, in our findings with either deficiency or overexpression of SK3 channels, we did not observe neuroprotection.

The dyskinetic movements that appear after L-DOPA chronic treatment are correlated to behavioral assessments of motor function and to dopaminergic depletion at SNc (Lundblad et al, 2004). This study was a pioneer at investigating the role of SK3 channels in the development of LID. Here we found that daily doses of 25mg/kg were capable of inducing AIMs in WT and SK3-KO mice starting since the first day of the treatment. The recommended dose of L-DOPA to induce dyskinesia in 6-OHDA lesioned mice is range from 6 to 30 mg/kg/day (Cenci & Lundblad, 2007). Besides having a similar dopaminergic loss (proved later by TH immunoreactivity) as both WT and KO group, the SK3 overexpressed mice did not present AIMs at any point of the treatment.

The mechanisms underlying the generation of LIDs are not fully understood. The general pathophysiological interpretation of LID is that aberrant DA metabolism elicits abnormal responses in the post-synaptic neurons via supersensitive DA receptors (reviewed in Francardo & Cenci, 2014; Jenner, 2008). Indeed, the notion that the capacity of the dopaminergic terminals to synthesize and store dopamine diminishes with PD progression suggests a presynaptic mechanism underlying the generation of motor fluctuations. It has been established that dyskinetic mice show a high striatal expression of molecular markers of LID, such as prodynorphin mRNA and Δ FosB (Lundblad et al, 2004; Pavon et al, 2006) and signaling proteins as ERK1/2 (Pavon et al 2006; Alcacer, 2012) and DARPP-32 (Santini et al, 2007).

Neuroinflammation is a main component of PD neuropathology and many experimental evidence points to inflammatory mechanisms as contributors also on LID. Increased expression of inflammatory markers, such as the enzymes COX2 in neurons and iNOS in glial cells were found in lesioned striatum in rat model of LID (Bortolanza et al, 2015a, b). L-DOPA treatment in DA denervated animals enhances neuronal activity in the striatum and a pro-inflammatory environment characterized by both astrogliosis and microglial activation along with an induction of the proinflammatory mediators, such as TNF- α (Pisanu et al, 2018) and IL-1 β (Barnum et al, 2008). The striatal pro-inflammatory environment may be induced by excessive levels of neurotransmitters such as glutamate e and

DA that are released following the administration of L-DOPA (reviewed in Del-Bel et al, 2016). Since it has become clear the role of microglial activation in the pathophysiology of PD and LID, we investigate a possible different pattern of activation in mice with altered SK3 expression. Corroborating with the literature, in all groups we found increased microglia activation at the lesioned striatum, compared to unlesioned side. Although SK3 channels are present in striatal microglia and contribute to its activation (Schlichter et al, 2010), we did not find any difference between SK3-T/T and SK3-KO, compared to WT mice, at the microglial activation.

Our findings can indicate that ion channels, more specifically SK3, may represent a new pathway to try to unveil the molecular mechanisms responsible for the development of LID in mice model of PD. It is crucial to continue to investigate how related and the mechanisms behind the modulation of LID by SK3 channels, since the altered expression of LID in overexpressed SK3 mice it is not due to differences of the extent of DA lesion in striatum and SNc or microglia activation. Further studies could investigate the presence of those molecular markers of LID as well as DA levels at striatum of SK3-T/T mice, to elucidate the absence of LID in these animals and provide more clarification to our results.

Extracurricular activities Besides the laboratory activities related to the present project, the student participated in other tasks and techniques that contributed to her scientific improvement. The student accompanied Dr. Alline Campos on her daily experiments at the laboratory, which included techniques such as **cell culture, immunocytochemistry, protein dosage and, western blotting**. At Prof. Tiago Outeiro's laboratory, the student attended weekly **lab meetings** where the graduate students presented recent papers on the field of Parkinson's disease.

Events In order to be allowed to start the experiment with mice, the student attended a **Laboratory Animal Course** at Universitätsmedizin Göttingen from 26 to 30 of November 2018. The course encompassed theoretical and practical basic laboratory procedures in mice and rats, such as drug treatment, surgeries, anesthesia and, euthanasia.

The student also prepared a **poster** with the current results to be presented at the **International Basal Ganglia Society (IBAGS)** meeting in April (2019) that was held in Biarritz- France.

References

- Alcacer, C., Santini, E., Valjent, E., Gaven, F., Girault, J. A., & Hervé, D. (2012). Gaolf mutation allows parsing the role of cAMP-dependent and extracellular signal-regulated kinase-dependent signaling in L-3, 4-dihydroxyphenylalanine-induced dyskinesia. *Journal of Neuroscience*, 32(17), 5900-5910.
- Alvarez-Fischer, D., Noelker, C., Vulinović, F., Grünewald, A., Chevarin, C., Klein, C., ... & Hartmann, A. (2013). Bee venom and its component apamin as neuroprotective agents in a Parkinson disease mouse model. *PLoS One*, 8(4), e61700.
- Albin, R. L., Young, A. B. & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Perspectives on disease 12* (10), 366-375.
- Bagga, V., Dunnett, S. B., & Fricker, R. A. (2015). The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease—Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. *Behavioural brain research*, 288, 107-117.
- Barcia, C., Ros, C. M., Annese, V., Gómez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Llera, D., ... & Herrero, M. T. (2011). IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell death & disease*, 2(4), e142.
- Barnum, C. J., Eskow, K. L., Dupre, K., Blandino Jr, P., Deak, T., & Bishop, C. (2008). Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: Role for interleukin-1 β . *Neuroscience*, 156(1), 30-41.
- Bi, F., Li, F., Huang, C. & Zhou, H. (2013) Pathogenic mutation in VPS35 impairs its protection against MPP(+) cytotoxicity. *Int J Biol Sci* 9(2), 149-155.
- Bortolanza, M., Cavalcanti-Kiwiatkoski, R., Padovan-Neto, F. E., Aparecida-da-Silva, C., Mitkovski, M., Raisman-Vozari, R & Del-Bel, E. (2015). 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.
- Boix, J., Padel, T., & Paul, G. (2015). A partial lesion model of Parkinson's disease in mice—Characterization of a 6-OHDA-induced medial forebrain bundle lesion. *Behavioural brain research*, 284, 196-206.
- Can, A., Dao, D. T., Terrillion, C. E., Piantadosi, S. C., Bhat, S., & Gould, T. D. (2012). The tail suspension test. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (59), e3769. doi:10.3791/3769
- Carta, A. R., Frau, L., Pontis, S., Pinna, A., & Morelli, M. (2008). Direct and indirect striatal efferent pathways are differentially influenced by low and high dyskinetic drugs: behavioural and biochemical evidence. *Parkinsonism & related disorders*, 14, S165-S168.
- 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. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2694–2706.
- Cenci, M. A., & Lundblad, M. (2007). Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. *Current protocols in Neuroscience*, 41(1), 9-25.
- Cenci, M. A., & Konradi, C. (2010). Maladaptive striatal plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. In *Progress in brain research* (Vol. 183, pp. 209-233). Elsevier.
- Cryan, J.F. & Slattery, D.A. (2007) Animal models of mood disorders: recent developments. *Curr Opin Psychiatry* 20, 1–7
- Dauer, W. & Przedborski, S., (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39, 889–909.

- 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(12), 479-500.
- Dolga, A. M., De Andrade, A., Meissner, L., Knaus, H. G., Höllerhage, M., Christophersen, P., ... & Culmsee, C. (2014). Subcellular expression and neuroprotective effects of SK channels in human dopaminergic neurons. *Cell death & disease*, 5(1), e999.
- Doo, A. R., Kim, S. T., Kim, S. N., Moon, W., Yin, C. S., Chae, Y., ... & Park, H. J. (2010). Neuroprotective effects of bee venom pharmaceutical acupuncture in acute 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurological research*, 32(sup1), 88-91.
- dos-Santos-Pereira, M., da-Silva, C. A., Guimarães, F. S., & Del-Bel, E. (2016). Co-administration of cannabidiol and capsazepine reduces L-DOPA-induced dyskinesia in mice: possible mechanism of action. *Neurobiology of disease*, 94, 179-195.
- Dror V, Shamir E, Ghanshani S, Kimhi R, Swartz M, Barak Y, Weizman R, Avivi L, Litmanovitch T, Fantino E, et al (1999). hKCa3/KCNN3 potassium channel gene: association of longer CAG repeats with schizophrenia in Israeli Ashkenazi Jews, expression in human tissues and localization to chromosome 1q21. *Mol Psychiatry*. 4, 254–260.
- Eder, C. (2010). Ion channels in monocytes and microglia/brain macrophages: promising therapeutic targets for neurological diseases. *Journal of neuroimmunology*, 224(1-2), 51-55.
- Farber, K & Kettenmann H (2006). Functional role of calcium signals for microglial function. *Glia*, 54,656-665.
- Francardo, V., & Cenci, M. A. (2014). Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. *Parkinsonism & related disorders*, 20, S20-S22.
- Glajch, K. E., Fleming, S. M., Surmeier, D. J., & Osten, P. (2012). Sensorimotor assessment of the unilateral 6-hydroxydopamine mouse model of Parkinson's disease. *Behavioural brain research*, 230(2), 309–316. doi:10.1016/j.bbr.2011.12.007
- Grube, S., Gerchen, M. F., Adamcio, B., Pardo, L. A., Martin, S., Malzahn, D., ... & Radyushkin, K. A. (2011). A CAG repeat polymorphism of KCNN3 predicts SK3 channel function and cognitive performance in schizophrenia. *EMBO molecular medicine*, 3(6), 309-319.
- Han S, Lee K, Yeo J, Kweon H, Woo S, et al. (2007) Effect of honey bee venom on microglial cells nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha production stimulated by LPS. *J Ethnopharmacol* 111, 176–181.
- Hirsch E., S. Hunot, P. Damier, B. Faucheux (1998). Glial cells and inflammation in Parkinson's disease: a role in neurodegeneration? *Ann Neurol*, 44 S115–S120.
- Hirsch, E.C. & Hunot, S. (2009). Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet Neurol*. 8, 382–397.
- Hoffmann A, Kann O, Ohlemeyer C, Hanisch UK, Kettenmann H. (2003). Elevation of basal intracellular calcium as a central element in the activation of brain macrophages (microglia): suppression of receptor-evoked calcium signaling and control of release function. *J Neurosci*, 23,4410-4419.
- 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), 1-10.
- Jacobsen, J. P. R., Weikop, P., Hansen, H. H., Mikkelsen, J. D., Redrobe, J. P., Holst, D., ... & Mirza, N. R. (2008). SK3 K⁺ channel-deficient mice have enhanced dopamine and serotonin release and altered emotional behaviors. *Genes, Brain and Behavior*, 7(8), 836-848.
- Jenner, P. (2008). Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(9), 665–677. doi:10.1038/nrn2471

- Kaur, K., Gill, J. S., Bansal, P. K., & Deshmukh, R. (2017). Neuroinflammation-A major cause for striatal dopaminergic degeneration in Parkinson's disease. *Journal of the neurological sciences*, 381, 308-314.
- Kaushal V, Koeberle PD, Wang Y, Schlichter LC (2007). The Ca²⁺-activated K⁺ channel KCNN4/KCa3.1 contributes to microglia activation and nitric oxide-dependent neurodegeneration. *J Neurosci*, 27, 234-244.
- Khanna R, Roy L, Zhu X, Schlichter LC (2011). K⁺ channels and the microglial respiratory burst. *Am J Physiol Cell Physiol*, 280, C796-806.
- Kim J, Yang EJ, Lee M, Kim Y, Huh Y, et al. (2011) Bee venom reduces neuroinflammation in the MPTP-induced model of Parkinson's disease. *Int J Neurosci* 121, 209–217.
- Kohler M, Hirschberg B, Bond CT, Kinzie JM, Marrion NV, Maylie J, Adelman JP (1996). Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain. *Science*, 273:1709-1714.
- Lazzarini, M., Martin, S., Mitkovski, M., Vozari, R. R., Stuehmer, W., & Bel, E. D. (2013). Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. *Glia*, 61(7), 1084-1100.
- Lundblad, M., Andersson, M., Winkler, C., Kirik, D., Wierup, N., Cenci, M.A., (2002). Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. *Eur. J. Neurosci.* 15, 120–132.
- Lundblad, M., Picconi, B., Lindgren, H., & Cenci, M. A. (2004). A model of L-DOPA-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine lesioned mice: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiology of disease*, 16(1), 110-123.
- Marinova-Mutafchieva, L., Sadeghian, M., Broom, L., Davis, J. B., Medhurst, A. D., & Dexter, D. T. (2009). Relationship between microglial activation and dopaminergic neuronal loss in the substantia nigra: a time course study in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry*, 110(3), 966-975.
- Maurice, N., Deltheil, T., Melon, C., Degos, B., Mourre, C., Amalric, M., & Kerkerian-Le Goff, L. (2015). Bee venom alleviates motor deficits and modulates the transfer of cortical information through the basal ganglia in rat models of Parkinson's disease. *PloS one*, 10(11), e0142838.
- Mogi M., M. Harada, P. Riederer, H. Narabayashi, J. Fujita, T. Nagats (1994). Interleukin-1 beta growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients *Neurosci Lett*, 180 147–150
- Mogi, M., Kondo, T., Mizuno, Y., & Nagatsu, T. (2007). p53 protein, interferon- γ , and NF- κ B levels are elevated in the parkinsonian brain. *Neuroscience letters*, 414(1), 94-97.
- Olanow, C.W. (2007). The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease. *Mov disord* 22(17), 335-342.
- Pisanu, A., Boi, L., Mulas, G., Spiga, S., Fenu, S., & Carta, A. R. (2018). Neuroinflammation in l-DOPA-induced dyskinesia: beyond the immune function. *Journal of Neural Transmission*, 125(8), 1287–1297. doi:10.1007/s00702-018-1874-4
- 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.
- Park, H. J., Lee, S. H., Son, D. J., Oh, K. W., Kim, K. H., Song, H. S., et al. (2004). Antiarthritic effect of bee venom: Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of nf-kappab through interaction with the p50 subunit. *Arthritis and Rheumatism*, 50, 3504–3515.
- Park, H. J., Son, D. J., Lee, C. W., Choi, M. S., Lee, U. S., Song, H. S., et al. (2007). Melittin inhibits inflammatory target gene expression and mediator generation via interaction with ikappab kinase. *Biochemical Pharmacology*, 73, 237–247.

- Pavón, N., Martín, A. B., Mendiola, A., & Moratalla, R. (2006). ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. *Biological psychiatry*, 59(1), 64-74.
- Paxinos, G. & Watson, C. (2007). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pedarzani, P., & Stocker, M. (2008). Molecular and cellular basis of small-and intermediate-conductance, calcium-activated potassium channel function in the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(20), 3196-3217.
- Reich, S. G. & Savitt, J. M. (2019). Parkinson's Disease. *Medical Clinics of North America*, 103(2), 337-350.
- Sailer, C. A., Kaufmann, W. A., Marksteiner, J., & Knaus, H. G. (2004). Comparative immunohistochemical distribution of three small-conductance Ca²⁺-activated potassium channel subunits, SK1, SK2, and SK3 in mouse brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(3), 458-469.
- Santini E, Valjent E, Usiello A, Carta M, Borgkvist A, Girault JA, et al... (2007). Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. *J Neurosci*, 27(26), 6995– 7005.
- Schallert T, Fleming SM, Leasure JL, Tillerson JL, & Bland ST. (2000). CNS plasticity and assessment of forelimb sensorimotor outcome in unilateral rat models of stroke, cortical ablation, parkinsonism and spinal cord injury. *Neuropharmacology*, 39, 777-87.
- Schlichter, L. C., Kaushal, V., Moxon-Emre, I., Sivagnanam, V., & Vincent, C. (2010). The Ca²⁺ activated SK3 channel is expressed in microglia in the rat striatum and contributes to microglia-mediated neurotoxicity in vitro. *Journal of neuroinflammation*, 7(1), 4.
- Son, D. J., Lee, J. W., Lee, Y. H., Song, H. S., Lee, C. K., & Hong, J. T. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115, 246–270.
- Stocker M (2004). Ca²⁺-activated K⁺ channels: molecular determinants and function of the SK family. *Nat Rev Neurosci*, 5, 758-770.
- Taylor, J. M., Main, B. S., & Crack, P. J. (2013). Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. *Neurochem intern*, 62(5), 803-819.
- Wang, Y., Qu, L., Wang, X. L., Gao, L., Li, Z. Z., Gao, G. D., & Yang, Q. (2015). Firing pattern modulation through SK channel current increase underlies neuronal survival in an organotypic slice model of Parkinson's disease. *Molecular neurobiology*, 51(1), 424-436.
- Winkler, C., Kirik, D., Björklund, A., Cenci, M.A. (2002). L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol. Dis.* 10, 165–186.
- Wojtera, M., Sikorska, B., Sobow, T., & Liberski, P.P. (2005). Microglial cells in neurodegenerative disorders. *Folia Neuropathol.* 43, 311–321.
- Wolfart, J., Neuhoff, H., Franz, O., & Roeper, J. (2001). Differential expression of the small-conductance, calcium-activated potassium channel SK3 is critical for pacemaker control in dopaminergic midbrain neurons. *Journal of Neuroscience*, 21(10), 3443-3456.
- Zhang, Q. S., Heng, Y., Yuan, Y. H., & Chen, N. H. (2017). Pathological α -synuclein exacerbates the progression of Parkinson's disease through microglial activation. *Toxicology letters*, 265, 30-37.