

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

Adrielle Ingrid de Oliveira Barbosa Santiago

**Caracterização do perfil astrocitário na Substância Negra de ratos com discinesia induzida por L-DOPA e tratados com doxiciclina**

Ribeirão Preto  
2022

Adrielle Ingrid de Oliveira Barbosa Santiago

Caracterização do perfil astrocitário na Substância Negra de ratos com discinesia induzida por L-DOPA e tratados com doxiciclina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Área de concentração:** Fisiologia

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

**Ribeirão Preto  
2022**

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

### **Ficha Catalográfica**

Santiago, Adrielle Ingrid de Oliveira Barbosa

Caracterização do perfil astrocitário da Substância Negra de ratos com discinesia induzida por L-DOPA e tratados com doxiciclina

Ribeirão Preto, 2022.

90p.; il.; 30cm

Dissertação de mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. Área de concentração: Fisiologia.

Orientadora: Del Bel, Elaine.

1. Doença de Parkinson; 2. Neuroinflamação; 3. Discinesia induzida por L-DOPA; 4. Astrócitos; 5. Doxiciclina.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Santiago, Adrielle Ingrid de Oliveira Barbosa. **Caracterização do perfil astrocitário na Substância Negra de ratos com discinesia induzida por L-DOPA e tratados com doxiciclina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

Profa. Dra. Elaine Aparecida  
Bel Belluz Guimarães.

Del

Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: FORP – USP.

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura: \_\_\_\_\_

*“Não importa que você vá devagar,  
contanto que você não pare.”*

Confúcio

Àqueles que me amaram incondicionalmente,  
me fortaleceram, protegeram, incentivaram e  
tornaram tudo isso possível:

*Meu querido pai, Helder*

*Minha amada mãe, Vandete*

*Meu parceiro de vida, André*

## Agradecimentos

Escrever isso aqui é como ver um filme passar pela minha cabeça, me vem diferentes nomes, rostos, abraços e apoios. Quanto mais eu penso, maior é a lista de pessoas que tenho para agradecer, ao mesmo tempo o medo de esquecer de alguém se faz presente. Como sempre digo: sou muito abençoada, tenho na minha vida as melhores pessoas!

A Deus e toda a espiritualidade, por tanto amparo, força e proteção.

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e no meu potencial, que me ensinaram que nada nessa vida vem fácil, mas que tudo é possível. Vocês sempre foram e sempre serão meu porto seguro. Saber que eu tenho vocês me dá segurança para fazer qualquer coisa, porque não importam as possibilidades de erro, afinal, vocês sempre estarão aí para me acolher e me ajudar a recomeçar. Obrigada por tantas vezes terem abdicado de vocês mesmos, por me escolherem, mesmo quando isso significava sacrificar seus próprios sonhos. Vocês são maravilhosos!

Ao meu companheiro de vida, que me escolhe dia após dia, faz questão de dizer o quanto se orgulha de mim, esteve comigo em tantos momentos tempestivos, e ainda assim continua me amando. Se a cada novo dia eu estava pronta para continuar é porque você limpou minhas lágrimas, pegou cada pedacinho quebrado, e com muita paciência me colocou de pé e sussurrou, incansavelmente, no meu ouvido que acredita na minha capacidade. Faltam palavras para expressar todos os motivos pelos quais eu sou grata a você, mas saiba que essa é uma conquista nossa.

Aos meus queridos amigos, que torceram, se emocionaram, ficaram furiosos, comemoraram, que, no fim das contas, viveram tudo isso comigo. Alguns de vocês são “amigos herdados”, sim herdados, que eram amigos dos meus pais, do André ou de outros amigos e eu me apropriei, outros foram presente do Gris, outros se aproximaram por ocasião do cursão, alguns deixaram de ser “fulano de tal lugar”, e passaram a ser amigos queridos, enfim, a todos vocês que a vida se encarregou de fazer cruzar meu caminho, que comigo brindaram diversas taças de vinho, roubaram docinho das festas, colocaram etiquetas nos tubos, apresentaram trabalhos, sonharam, choraram e me fizeram ter a certeza de não estar sozinha. Obrigada por tudo.

À professora Elaine, que me aceitou em seu laboratório, abriu para mim as portas de um mundo até então inalcançável, me colocou de volta nos trilhos corretos quando eu estava perdida, me mostrou que ser uma mulher forte não é uma opção e sim uma obrigação. Muito obrigada, professora, por me aceitar mesmo sabendo das minhas (muitas) limitações, por ter

me dado todas as condições de estudar, por me incentivar a ser melhor tanto como pessoa quanto como profissional e por não ter me deixado desistir.

A todo o pessoal do laboratório, tanto os que ainda fazem parte do grupo quanto aqueles já que alçaram novos voos. Todos vocês foram essenciais de formas que eu sei que não imaginam. Obrigada pelos cafés, da manhã e da tarde, pelos almoços, os quais eu nunca conseguia decidir onde seriam, pelas caronas, pelas lágrimas enxugadas e por aquelas que choramos juntos, pelos abraços e incentivos, pelas compras que fizemos juntos, pelos bolos de aniversário, enfim, vocês tornaram tudo mais fácil e transformaram até dias comuns em dias inesquecíveis.

A Glauce e ao Maurício, que fazem parte de parágrafos anteriores, mas merecem uma parte única aqui, da mesma forma que tem no meu coração.

Glau, espero que você saiba que contar com o seu apoio foi fundamental para mim durante esse período. Com você, eu aprendi mais do que ciência, eu aprendi sobre ser gentil, acolhedora, confiar no próximo, demonstrar carinho em coisas pequenas, ajudar sempre. Sou grata pela oportunidade de aprender a ser melhor dia a dia, e que isso não significa ser perfeita e não passar por problemas, mas que estando com as pessoas certas tudo fica mais fácil. Obrigada, obrigada, obrigada, mil vezes obrigada!

Meu amigo Maurício, que privilégio poder ser amiga e conviver com uma pessoa tão inteligente, sincera, centrada, empática, risonha e maravilhosa como você. Obrigada por todos os conselhos, lágrimas enxugadas, abraços, almoços, por poder confidenciar coisas a você e nunca me julgar, enfim, obrigada por ser quem você é e por me permitir fazer da sua vida.

Ao departamento de Fisiologia, em especial a Claudia, que é uma pessoa tão querida, prestativa e paciente (e haja paciência para responder todos os meus e-mails e me ajudar a emitir todas as declarações que precisei).

A todos os funcionários da Universidade, que a mantém de pé e em pleno funcionamento, em especial Célia, Júnia e Karol.

Por fim, quero dedicar a todos vocês uma citação de Carl Sagan: “Diante da vastidão do tempo e da imensidão do espaço, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você.”



O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (Capes) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

SANTIAGO, A. I. O. B. **Caracterização do perfil astrocitário na Substância Negra de ratos com discinesia induzida por L-DOPA e tratados com doxiciclina.** 2022.90p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A discinesia induzida por (L-dihidroxyfenilalanina) L-DOPA (LID) é um efeito debilitante do tratamento da doença de Parkinson com este medicamento. Novas abordagens terapêuticas que previnam ou atenuem esse efeito colateral são necessárias. Ratos Wistar hannover machos (CEUA/FORP - Processo 2016.1.667.58.4) adultos submetidos a lesão unilateral do feixe prosencefálico medial induzida por 6-hidroxi dopamina foram tratados com L-DOPA (20 mg kg<sup>-1</sup> oral) uma vez ao dia por 14 dias. Após esse período, testamos se a doxiciclina (40 mg kg<sup>-1</sup>, intraperitoneal) poderia reverter a LID já estabelecida e se a doxiciclina administrada junto com L-DOPA impede o desenvolvimento de LID. A quantidade de células imunorreativas a (Proteína glial fibrilar ácida) GFAP e seu perfil reativo, por quantificação morfológica (número e comprimento de ramificações) foram analisados em estriado e substância negra dos animais parkinsonianos e discinéticos. Uma única injeção de doxiciclina atenuou a LID e o co-tratamento com doxiciclina desde o primeiro dia de levodopa suprimiu o aparecimento de discinesia. O tratamento prolongado com L-DOPA aumentou o número de células imunorreativas ao GFAP no estriado dorsomedial e dorsocaudal, ipsilateral à lesão, com aumento do número de ramificações. Na SN-compacta dorsal lateral, medial e caudal, assim como na SN-reticulada foram observadas modificações no número de células imunorreativas ao GFAP assim como do número e comprimento das ramificações. O tratamento crônico com doxiciclina atenuou os sinais de ativação dos astrócitos nas subdivisões da substância negra estudadas. O presente estudo indica que a discinesia induzida por L-DOPA envolve alterações em astrócitos em ambos, estriado e substância negra, e que o efeito anti-discinético da doxiciclina é, em parte, explicado por modulação astrocitária em substância negra. O tratamento com doxiciclina foi associado à diminuição da imunorreatividade de GFAP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Neuroinflamação. Discinesia induzida por L-DOPA. Astrócitos. Doxiciclina.

## **ABSTRACT**

**SANTIAGO, A. I. O. B. Characterization of the astrocytic profile in the Substantia Negra of rats with dyskinesia induced by L-DOPA and treated with doxycycline.** 2022,90p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

L-DOPA (L-dihydroxyphenylalanine)-induced dyskinesia (LID) is a debilitating effect of Parkinson's disease treatment with this drug. New therapeutic approaches that prevent or attenuate this side effect are needed. Adult male Wistar hannover rats (CEUA/FORP - Process 2016.1.667.58.4) undergoing unilateral medial forebrain bundle injury induced by 6-hydroxydopamine were treated with L-DOPA (20 mg kg<sup>-1</sup> orally) once a day for 14 days. After this period, we tested whether doxycycline (40 mg kg<sup>-1</sup>, intraperitoneal) could reverse established LID and whether doxycycline administered together with L-DOPA prevents the development of LID. The amount of GFAP (glial fibrillary acidic protein) immunoreactive cells and their reactive profile, by morphological quantification (number and length of branches) were analyzed in striatum and substantia nigra of parkinsonian and dyskinetic animals. A single injection of doxycycline attenuated LID and co-treatment with doxycycline from the first day of levodopa suppressed the onset of dyskinesia. Prolonged treatment with L-DOPA increased the number of GFAP-immunoreactive cells in the dorsomedial and dorsocaudal striatum, ipsilateral to the lesion, with an increase in the number of ramifications. In the SNcompact dorsal, lateral, medial and caudal, as well as in the SNreticulated, changes were observed in the number of GFAP-immunoreactive cells as well as in the number and length of branches. Chronic treatment with doxycycline attenuated the activation signals of astrocytes in the subdivisions of the substantia nigra studied. The present study indicates that L-DOPA-induced dyskinesia involves changes in astrocytes in both the striatum and substantia nigra, and that the antidyskinetic effect of doxycycline is, in part, explained by astrocytic modulation in the substantia nigra. Doxycycline treatment was associated with decreased GFAP immunoreactivity.

**Keywords:** Parkinson's disease. Neuroinflammation. L-DOPA-induced dyskinesia. Astrocyte. Doxycycline.

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

AADC – Descarboxilase de aminoácidos aromáticos

AB – Avidina biotina

ALDH – Aldeído desidrogenase

AMPc – Monofosfato de adenosina cíclica

AP – Anteroposterior

BSA – Bovine serum albumin (albumina de soro bovino)

CEUA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

COMT - CatecolO-metiltransferase

CONCEA – Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal

DA – Dopamina

DAB – Diaminobenzidina

DOX – Doxiciclina

DOPAL – Dihydroxyphenyl acetaldeído

DP – Doença de Parkinson

DV – Dorso-ventral

FORP – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

FPM – Feixe prosencefálico medial

GDNG – Glial derived neurotrophic factor (fator neural derivado da glia)

GFAP - Proteína glial fibrilar ácida

GPi – Globo pálido interno

GPe – Globo pálido externo

HVA – Ácido homovanílico

HRP – Horseradish peroxidase

i.p – Intraperitoneal

LL – Latero lateral

L-DOPA – Levodopa

LID – Discinesia induzida por L-DOPA

LPS – Lipopolissacarídeo

MAO-B – Monoamina oxidase B  
MEC – Matriz extracelular  
MIN – Minociclina  
MMP – Metaloproteinase da matriz  
NST – Núcleo subtalâmico  
PBS – Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)  
PFA – Paraformaldeído  
SNC – Sistema nervoso central  
SNc – Substância negra compacta  
SNr – Substância negra reticulada  
SN – Substância Negra  
TBS – Tris buffered saline (Tris salina tamponada)  
TH – Tirosina hidroxilase  
TNF $\alpha$  – Fator de necrose tumoral alfa  
USP – Universidade de São Paulo  
VA – Região ventral anterior  
VL – Região ventral lateral  
VEGF - Fator de crescimento do endotélio vascular  
VMAT2 – transportador de monoaminas vesicular 2

## LISTA DE FÓRMULAS MOLECULARES

$C_{12}H_{22}O_{11}$  – Sacarose

$C_6H_8O_7$  – Ácido cítrico

$H_2O$  – Água destilada

$HCl$  – Ácido clorídrico

$KCl$  – Cloreto de potássio

$KH_2PO_4$  – Fosfato monopotássico

$Na_2HPO_4$  – Fosfato dissódico

$Na_3C_6H_5O_7$  – Citrato de sódio

$NaCl$  – Cloreto de sódio

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Caracterização das vias direta e indireta.....	Pág. 22
<b>Figura 2:</b> Características fisiopatológicas da DP.....	Pág. 24
<b>Figura 3:</b> Alvos de drogas dopaminérgicas na DP.....	Pág. 25
<b>Figura 4:</b> As tetraciclinas podem proteger contra a morte celular neuronal.....	Pág. 31
<b>Figura 5:</b> Esquema mostrando os bregmas e as regiões selecionadas para quantificação de células GFAP+ na SN.....	Pág. 42
<b>Figura 6:</b> Protocolo de análise morfológica das células GFAP+.....	Pág. 43
<b>Figura 7:</b> Análise do número de células GFAP-imunopositivas em estriado de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.....	Pág. 47
<b>Figura 8:</b> Análise morfológica de células GFAP-imunopositivas no estriado de ratos hemiparkinsonianos após tratamento crônico com salina ou L-DOPA.....	Pág. 48
<b>Figura 9:</b> Análise do número de células GFAP-imunopositivas em SN de animais hemiparkinsonianos tratados com salina ou L-DOPA.....	Pág. 49
<b>Figura 10:</b> Análise morfológica (número de ramificações) de células GFAP-imunopositivas em SN de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.....	Pág. 50
<b>Figura 11:</b> Análise morfológica (comprimento médio das ramificações) de células GFAP-imunopositivas em SN de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.....	Pág. 51
<b>Figura 12:</b> Fotomicrografias de secções coronais de estriado representando imunomarcção de GFAP.....	Pág. 53
<b>Figura 13:</b> Fotomicrografias de secções coronais de SN representando imunomarcção de GFAP.....	Pág. 54
<b>Figura 14:</b> Delineamento experimental para tratamento crônico com L-DOPA e agudo com DOX.....	Pág. 84
<b>Figura 15:</b> Delineamento experimental para tratamento crônico e concomitante com DOX e L-DOPA.....	Pág. 84
<b>Figura 16:</b> Teste da caminhada.....	Pág. 87
<b>Figura 17:</b> Fotomicrografia de secções coronais de estriado e SN ilustrando a perda de imunomarcção TH positiva.....	Pág. 88

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Lista de consumíveis utilizados para realização dos experimentos.....	Pág. 35
<b>Tabela 2:</b> Lista de aparelhos utilizados para a realização dos experimentos.....	Pág. 35
<b>Tabela 3:</b> Lista de anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica.....	Pág. 39
<b>Tabela 4:</b> Lista de anticorpos secundários utilizados na imuno-histoquímica.....	Pág. 40
<b>Tabela 5:</b> Soluções para diafanização e tempo em cada uma .....	Pág. 41
<b>Tabela 6:</b> Análise de células GFAP-imunopositivas em SN compacta dorsal.....	Pág. 56
<b>Tabela 7:</b> Análise de células GFAP-imunopositivas em SN compacta lateral.....	Pág. 57
<b>Tabela 8:</b> Análise de células GFAP-imunopositivas em SN reticulada.....	Pág. 59
<b>Tabela 9:</b> Efeito do tratamento agudo com DOX sobre LID.....	Pág. 89
<b>Tabela 10:</b> Efeito do tratamento crônico com DOX sobre LID.....	Pág. 89



## SUMÁRIO

Agradecimentos .....	6
Resumo .....	10
Abstract .....	11
Lista de abreviações e siglas .....	12
Lista de fórmulas moleculares.....	14
Lista de ilustrações .....	15
Lista de tabelas .....	16
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.1 Núcleos da Base e Doença de Parkinson .....</b>	<b>19</b>
1.1.1 Sistema dopaminérgico.....	19
1.1.2 Vias direta e indireta.....	21
1.1.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	23
1.2 Doença de Parkinson discinesia induzida por L-DOPA.....	25
1.3 Neuroinflamação.....	27
1.3.1 Neuroinflamação na discinesia.....	29
1.4 Tetraciclinas.....	29
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>32</b>
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>34</b>
3.1 Materiais.....	35
3.1.1 Consumíveis utilizados.....	35
3.1.2 Equipamentos.....	35
3.1.3 Tampões e soluções.....	35
3.1.4 Drogas.....	36
3.2 Métodos.....	37
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre o número de células positivas para GFAP e sua morfologia no estriado e substância negra.....	46
4.1.1 Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre o número de células positivas para GFAP no estriado.....	46
4.1.2 Análise morfológica de células imunopositivas para a proteína GFAP no estriado após tratamento crônico com L-DOPA.....	47
4.1.3 Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre o número de células positivas para GFAP na SN.....	46
4.1.4 Análise morfológica de células imunopositivas para a proteína GFAP na SN após tratamento crônico com L-DOPA.....	50

4.2 Efeito do tratamento agudo e crônico com DOX sobre o número de células positivas para GFAP e sua morfologia na SN de animais hemiparkinsonianos com e sem discinesia induzida por L-DOPA.....	55
4.2.1 Efeito do tratamento agudo e crônico com DOX sobre células positivas para GFAP SN compacta dorsal.....	55
4.2.1 Efeito do tratamento agudo e crônico com DOX sobre células positivas para GFAP SN compacta lateral.....	56
4.2.1 Efeito do tratamento agudo e crônico com DOX sobre células positivas para GFAP SN reticulada.....	58
5. DISCUSSÃO.....	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
ANEXO A – análise comportamental.....	82



## 1.1 Núcleos da base e Doença de Parkinson

Os núcleos da base são um grupo de núcleos subcorticais que atravessam o telencéfalo, mesencéfalo e diencefalo (Albin, Young e Penney, 1989). Os núcleos da base são uma rede de neurônios altamente organizada, onde diferentes estruturas são ativadas para funções e circunstâncias específicas, como o controle do movimento, aprendizagem associativa, planejamento, memória de trabalho e emoção (Obeso et. al, 2008). Os núcleos da base compreendem: núcleo estriado ou caudado/putâmen, globo pálido (também chamado de globo pálido externo ou lateral; GPe), núcleo entopeduncular (também denominado globo pálido interno ou medial; GPi), substância negra compacta (SNc), substância negra reticulada (SNr) e núcleo subtalâmico (NST; Albin, Young e Penney, 1989; Parent e Hazrati, 1995; Bolam e Ellender, 2016).

Os núcleos caudado e putâmen formam o corpo estriado, principal núcleo de entrada de estímulos dos núcleos da base. Seus neurônios, chamados de espinhosos médios, são o local de entrada de sinais (*inputs*) vindos do córtex motor primário, área motora suplementar e do córtex pré-motor (Obeso et al., 2017). Estas aferências são excitatórias (glutamatérgicas; Albin, Young e Penney, 1989; Gerfen e Bolam, 2017). Além disso, esse núcleo também recebe aferências dopaminérgicas provenientes da SNc (Calabresi et. al, 1998) e serotoninérgicas dos núcleos da rafe (Hauber, 1998). As eferências estriatais se limitam a estruturas dos núcleos da base, como o globo pálido, o núcleo entopeduncular e a SN, em especial a SNr (Parent e Hazrati, 1995), sendo os neurônios de saída inibitórios (GABAérgicos). Tonicamente, os neurônios do GPi e da SNr inibem centros motores da região ventral anterior (VA) e ventral lateral (VL) do tálamo, que se projetam ao córtex, ao núcleo tegmental pedúnculo pontino e ao colículo superior (Parent e Hazrati, 1995).

### 1.1.1 Sistema Dopaminérgico

A dopamina (DA) é um neurotransmissor catecolaminérgico presente no sistema nervoso central e periférico, envolvidos no controle do movimento voluntário, cognição, recompensa, sono, memória, assim como na regulação do sistema simpático (equilíbrio do sódio, controle da pressão arterial, da função renal, homeostase glicária), e processos na retina (Beaulieu e Gainetdinov 2011; Pinoli et al. 2017). É principalmente sintetizado no cérebro, em neurônios da substância negra compacta, a partir do precursor L-dihidroxyphenylalanina (L-DOPA).

O grupo das catecolaminas inclui, além da dopamina, a noradrenalina e a adrenalina, e tem como principal precursor o aminoácido tirosina (Fernstrom e Fernstrom 2007). A tirosina é convertida em L-DOPA pela ação da enzima tirosina hidroxilase (TH, passo limitante da síntese de dopamina, sendo utilizada como marcador de neurônios dopaminérgicos). A L-DOPA, por sua vez, é convertida à dopamina pela ação da enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC; Christenson et al. 1970). A dopamina então é armazenada em vesículas pelo transportador de monoaminas vesicular 2 (VMAT2; Eiden e Weihe 2011). Em células noradrenérgicas e adrenérgicas, a dopamina é convertida em noradrenalina e adrenalina respectivamente (Udenfriend e Wyngaarden 1956; Weinshilboum et al. 1971).

O ambiente ácido do lúmen da vesícula estabiliza a noradrenalina e previne sua oxidação (Guillot e Miller 2009). Fora das vesículas, a dopamina é sensível à oxidação ou ao metabolismo adicional pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) em 3,4-Dihidroxyphenylacetaldeído (DOPAL) que é preferencialmente convertido em ácido 3, 4-dihidroxifenilacético (DOPAC) pela enzima aldeído desidrolase (ALDH). A enzima Catechol-O-Metiltransferase (COMT) pode degradar ainda mais o DOPAC em ácido homovanílico (HVA), além de converter diretamente a dopamina em 3-metoxitiramina (Eisenhofer et al. 2004; Chen et al. 2011). A dopamina e seus produtos finais podem ser quantificados em sangue e fluído espinhal cerebral, embora seja difícil determinar sua origem porque sua produção não acontece somente no sistema nervoso central (SNC), mas também em certos órgãos periféricos, como rim e intestino (José et al. 2002; Anlauf et al. 2003). Em patologias como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, as quantidades de HVA e 3-metoxitiramina estão correlacionadas com a progressão da doença. Assim, esses componentes podem ser biomarcadores úteis da evolução da doença (Morimoto et al. 2017; Stefani et al. 2017), pois podem contribuir para o diagnóstico (Reitz e Mayeux 2014)

Há cinco receptores distintos aos quais a dopamina se liga com diferente afinidade. Esses receptores foram divididos em duas classes: a família D1, que compreende o receptor de dopamina D1 e o D5, e a família D2, que compreende os receptores D2, D3 e D4 (Vallone et al. 2000; Beaulieu e Gainetdinov 2011; Pinoli et al. 2017). O subtipo semelhante ao D1 é frequentemente acoplado à proteína G $\alpha$ s/olf, família de proteínas G que estimulam a produção de monofosfato de adenosina cíclica (AMPC). O subtipo semelhante ao receptor D2 ativa classicamente a proteína G $\alpha$ E/S, família de proteínas G que inibem a produção de AMPC (Beaulieu e Gainetdinov 2011).

Os receptores da família D1 são encontrados principalmente no núcleo caudado-putâmen (estriado), núcleo acumbens, SNr, bulbo olfatório, amígdala e córtex frontal (Savasta et al. 1986; Wamsley et al. 1989). Já os receptores semelhantes a D2 são expressos principalmente no estriado, GPe, núcleo acumbens, área tegmental ventral, hipotálamo, amígdala, áreas corticais, hipocampo e glândula pituitária (Wamsley et al. 1989; Yokoyama et al. 1994).

Os neurônios dopaminérgicos da SN que se projetam para o estriado constituem a via nigrostriatal, que tem um papel no controle da função motora e da aprendizagem (Hikosaka et al. 2002). Essa via controla aspectos processuais dos movimentos e comportamentos motivados, uma vez que se projeta para áreas mais dorsais dos núcleos da base, onde os hábitos comportamentais e cognitivos são aprendidos e armazenados (Carli et al. 1985; Graybiel 1997; Haber 2003).

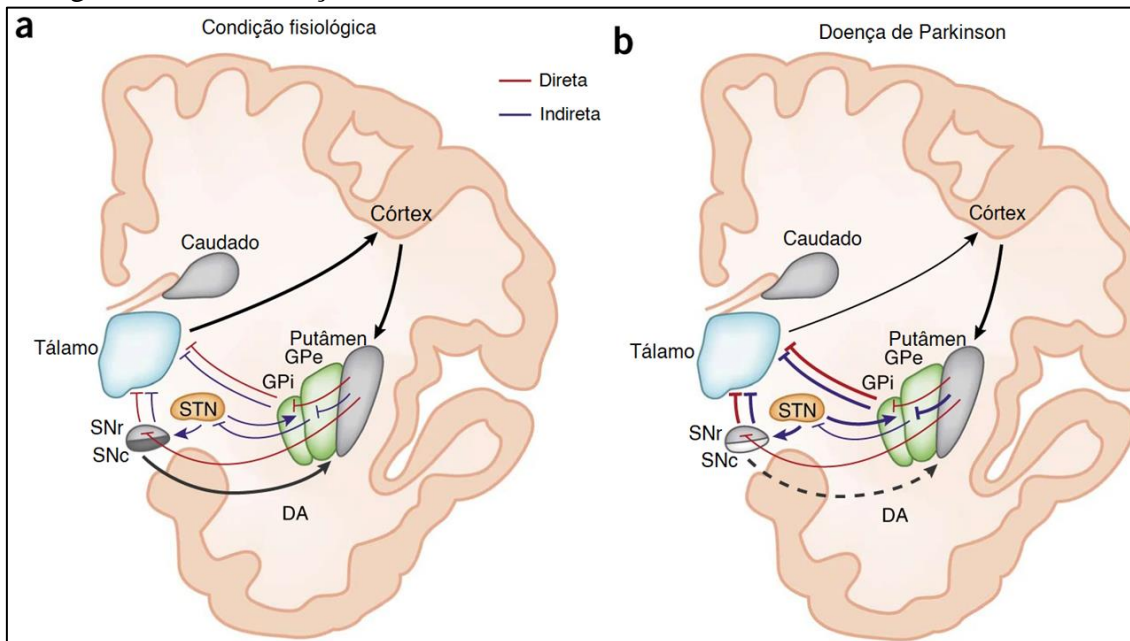
### *1.1.2 Vias direta e indireta*

O modelo predominante da função dos núcleos da base hipotetiza que o controle do movimento é feito por dois circuitos, conhecidos como via direta e via indireta (figura 1). Estes atuam de maneira dicotômica, por meio de diferentes populações de neurônios espinhosos médios que se projetam para diferentes estruturas de saída, estimulando o movimento adequado e inibindo o movimento inadequado (Albin, Young e Penney, 1989; Phillips et al. 1993; Calabresi et al. 2014). Há ainda uma terceira via, denominada hiperdireta (Nambu et al. 2002).

A via direta liga diretamente o estriado aos núcleos de saída, inibindo-os. Envolve a participação de receptores dopaminérgicos da família D1. Um estímulo cortical glutamatérgico ativa os neurônios espinhosos médios estriatais, que enviam eferências GABAérgicas para o GPi e SNr, inibindo-os, o que ocasiona uma desinibição dos neurônios talâmicos glutamatérgicos (VA e VL), que por sua vez se projetam para o córtex, resultando na ativação locomotora e facilitação de movimento (De Long, 1990).

A via indireta envolve ativação de receptores dopaminérgicos da família D2. Há inibição dos neurônios espinhosos médios do estriado sobre o GPe, que se projetam, também de maneira inibitória, para o NST, que por sua vez, emite eferências excitatórias (glutamatérgicas) para os neurônios inibitórios (GABAérgicos) da SNr, que inibem o tálamo (VA e VL), e conseqüentemente o córtex, ocasionando a redução da atividade locomotora e do movimento (De Long, 1990).

Figura 1: Caracterização das vias direta e indireta.



(A) Na condição fisiológica, acredita-se, que a dopamina (DA) decorrente da substância negra compacta (SNc) ative neurônios estriatais que expressão receptores D1 (no caso da via direta, ilustrada em vermelho) ou iniba os neurônios estriatais que expressão receptores D2 (quando da via indireta, ilustrada em azul, a fim de estimular o movimento adequado ou inibir o movimento inadequado). (B) Na doença de Parkinson, a degeneração de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais reduz a estimulação dos receptores de DA estriatais, levando a um desequilíbrio entre as vias direta (em vermelho) e indireta (em azul), ocasionando ativação anormal dos núcleos de saída e consequentemente distúrbios do movimento. Adaptado de Calabresi et al, 2014.

Uma terceira via, a hiperdireta, conduz estímulos excitatórios originados em áreas motoras corticais para os núcleos de saída (GPi/SNr), os quais são GABAérgicos. Estas saídas inibitórias diminuem a estimulação do tálamo (VA e VL) sobre o córtex levando assim a inibição do movimento (Kitai e Deniau, 1981; Nambu et al, 2002).

A perda de entrada dopaminérgica no estriado, que resulta da degeneração dos neurônios da substância negra, causa um desequilíbrio na atividade das vias direta e indireta. Em condição fisiológica, a dopamina exerce controle inibidor sobre a via indireta, portanto, após a perda de dopamina há um aumento na atividade desta via (Gerfen et al, 1990). Como resultado do aumento da entrada inibitória GABAérgica, a projeção GABAérgica do GPe para o NST torna-se sub-ativa (Jenner, 2008). Assim, os neurônios glutamatérgicos do NST tornam-se hiperativos, levando ao aumento da atividade dos neurônios inibitórios GABAérgicos no GPi que se projetam para o tálamo. Isso diminui o disparo neuronal talâmico e altera a entrada no córtex pré-motor (Jenner, 2008).

Em contrapartida, a dopamina exerce um efeito excitatório na via direta. A perda de dopamina leva à diminuição na atividade desta via (Gerfen et al, 1990), o que contribui para o aumento da atividade dos neurônios GABAérgicos que se projetam para o tálamo. Dessa

forma, alterações na atividade de ambas as vias alteram a saída tálâmica para os cortices pré-motor e motor que fornece entrada glutamatérgica para os núcleos da base, por meio da via corticostriatal (Jenner, 2008). Como consequência da depleção dopaminérgica e das alterações nas vias de saída dos núcleos da base, aparece o declínio do movimento voluntário e as alterações motoras que caracterizam a Doença de Parkinson (DP).

### *1.1.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson*

A primeira descrição dos sinais clínicos da DP foi feita por James Parkinson (1817 – descrito por Dauer e Przedborski, 2003; Tolouse e Sullivan, 2008). Desde então sabe-se que a DP apresenta além dos sintomas motores, uma gama de características não motoras. Foram realizados progressos na compreensão da neuropatologia desta doença e sua progressão no sistema nervoso, bem como os mecanismos moleculares e neurofisiológicos e perturbações subjacentes à doença e seus sintomas. Ademais, terapias focadas na substituição farmacológica de dopamina tornaram-se disponíveis, além de importantes refinamentos e expansões inovadoras, como a introdução de estimulação cerebral profunda.

A DP acomete em menor proporção indivíduos com menos de 50 anos de idade, mas a incidência aumenta de 5 a 10 vezes da sexta para a nona década de vida (Twelves, Perkins e Counsell, 2003; Van Den Eeden et al, 2003; Savica et al, 2013).. Geralmente afeta cerca de 1% da população com mais de 65 anos, e entre 4 e 5% das pessoas com mais de 85 anos (Masato et al., 2019). A DP é uma patologia de etiologia multifatorial, e embora 5 a 10% dos casos apresentem causas genéticas, outros fatores etiológicos são considerados, tais como condições imunológicas, ambientais e neuroinflamação (Masato et al., 2019; De Virgilio et al., 2016; Dexter e Jenner, 2013).

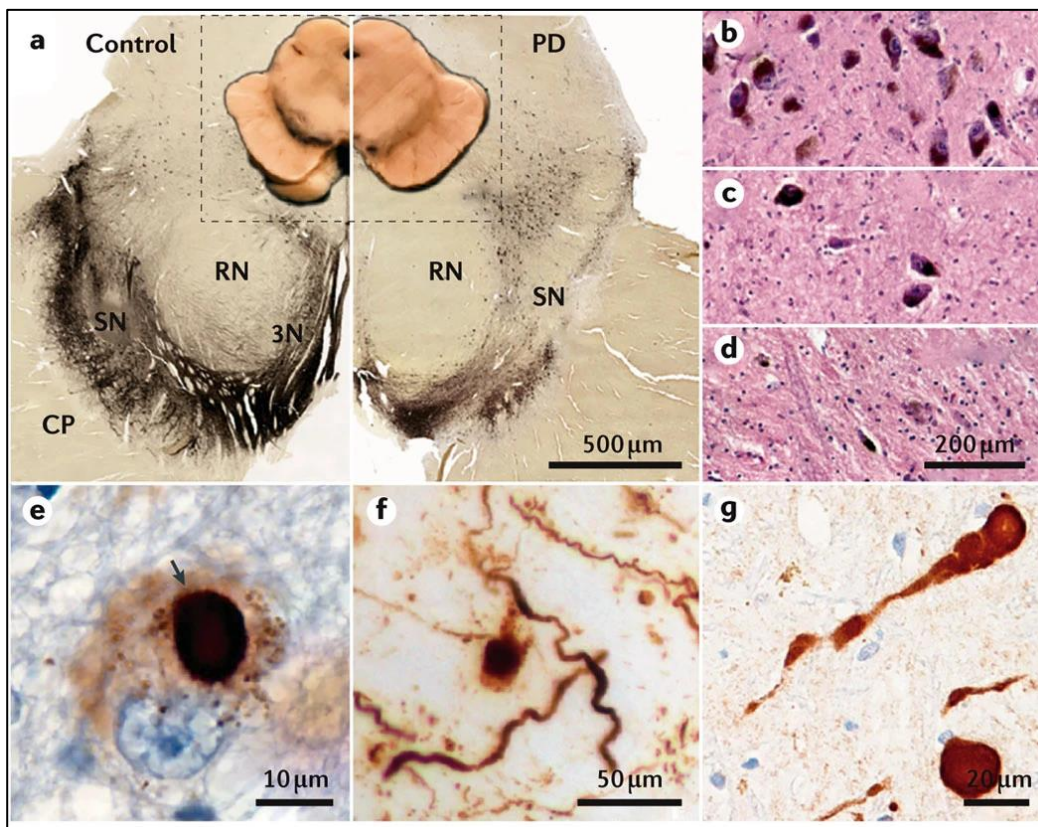
A DP é caracterizada pela degeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na SNc (Lotankar, Prabhavalkar e Bhatt, 2017). A DP também é caracterizada por inclusões proteicas, chamadas de corpos de Lewy constituídas principalmente pela proteína  $\alpha$ -sinucleína (Miki et al., 2017). Os corpos de Lewy são agregados fibrilares insolúveis presentes em neurônios na DP (Cieri, Brini e Calì, 2017). As principais características fisiopatológicas da DP estão representadas na figura 2.

A perda de cerca de 80% dos neurônios dopaminérgicos na SNc desencadeia diminuição gradual da velocidade e amplitude dos movimentos alternados e repetidos (bradicinesia), tremor em repouso (movimento involuntário, rítmico e oscilatório), rigidez (aumento no tônus muscular), alterações posturais e da marcha (Masato et al., 2019; Cabreira



e Massano, 2019). Há também os sintomas não motores que podem ser categorizados em anormalidades sensoriais, principalmente olfatórias, da visão e dor, mudanças de comportamento (em especial depressão e ansiedade), disfunções autonômicas (hipotensão ortostática, disfunção gastrointestinal e sintomas urinários), distúrbios de sono e fadiga (Pfeiffer, 2016).

Figura 2: Características fisiopatológicas da DP.

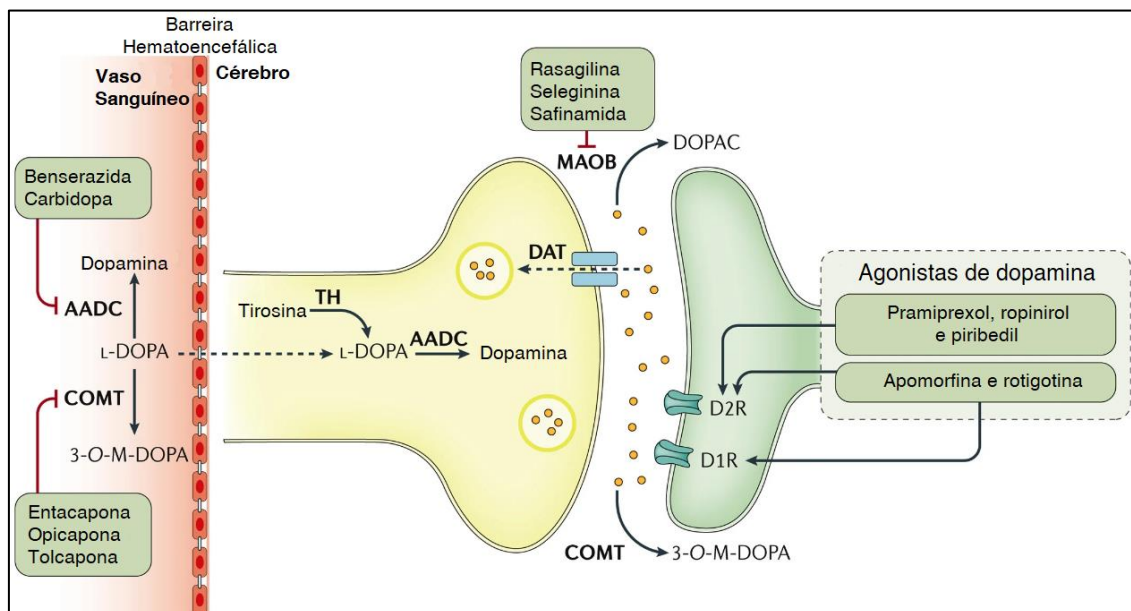


(a) Secção transversal do mesencéfalo humano imunomarcado com a enzima tirosina hidroxilase são mostradas. A DP é caracterizada pela despigmentação da substância negra (painel direito) em comparação com o controle (painel esquerdo). (b-d) A hematoxilina e a eosina da região ventrolateral da SN mostram uma distribuição normal de neurônios pigmentados em um controle saudável (b) e a perda celular moderada (c) ou grave (d) em pacientes do DP. (e-g) A coloração imunohistoquímica da  $\alpha$ -sinucleína mostra corpos de Lewy intracitoplasmáticos (demonstrado pela seta em e), depósitos mais difusos e granulares de  $\alpha$ -sinucleína (e e f), e esferoides de  $\alpha$ -sinucleína em axônios (g). Adaptado de Poewe et al, 2017.

O tratamento farmacológico para os sintomas motores da DP é primordialmente baseado na reposição de dopamina (figura 3), principalmente a terapia com L-DOPA (Fahn et al, 2004)], associada com benserazida ou carbidopa. A L-DOPA consegue atravessar a barreira hematoencefálica, e assim ser captada e convertida em dopamina. A associação com benserazida ou carbidopa tem o objetivo de prevenir a degradação da L-DOPA na corrente sanguínea, uma vez que a benserazida inibe a enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC; Yoosefian, Rahmanifar e Etminan, 2018). Podem também ser utilizados

inibidores das enzimas MAO-B e COMT (Müller e Möhr, 2019), que resulta em maior disponibilidade de dopamina, e agonistas de dopamina (Bracco et al., 2004)

Figura 3: Alvos de drogas dopaminérgicas na DP.



Os alvos pré-sinápticos incluem a reposição de L-DOPA combinada com inibidores periféricos ativos de aminoácidos aromáticos de decarboxilase (AADC) ou catechol-O-metiltransferase (COMT). Os inibidores da monoamina oxidase tipo B (MAOB) aumentam a disponibilidade sináptica de dopamina (endógena e exógena), enquanto os agonistas de dopamina atuam estimulando os receptores dopaminérgicos pós-sinápticos. A flecha tracejada do sangue para o cérebro designa o transporte da barreira hematoencefálica da L-DOPA. A seta tracejada através do transportador de dopamina (DAT) denota a recaptação da dopamina da fenda sináptica. 3-O-M-DOPA: 3-O-metil-DOPA; D1R: receptor de dopamina D1; D2R: receptor de dopamina D2; DOPAC: 3,4-ácido dioxico-fenilacético; TH: tirosina hidroxilase. Adaptado de Poewe et al, 2017.

Apesar de seu clássico emprego, o uso da L-DOPA a longo prazo está associado a complicações motoras, referidas como discinesia induzida por L-DOPA (LID; Lundblad et al., 2002). A incidência da LID é de cerca de 40% após 4 a 6 anos de tratamento (Turcano et al., 2018), com um risco especialmente alto em pacientes mais jovens tratados com altas doses de L-DOPA (Espay et al., 2018). Uma vez que a LID aparece, o controle dos sintomas torna-se um problema difícil. A LID tem um impacto negativo na qualidade de vida (Perez-Lloret et al., 2017) e às vezes é mais incapacitante do que a própria DP (Fahn, 2000).

## 1.2 Doença de Parkinson e discinesia induzida por L-DOPA

A LID é composta por três tipos: discinesia de dose de pico, discinesia fora do período e discinesia difásica (Chen et al, 2020). Um paciente pode ter um ou uma combinação de dois ou três tipos (Espay et al, 2018). A discinesia de pico de dose é a mais comum, e se relaciona com os níveis máximos L-DOPA, normalmente é coreiforme, predominantemente envolvendo

o pescoço, tronco e membros superiores e, ocasionalmente, músculos respiratórios (Cenci, Ohlin e Odin, 2014; Rascol, Perez-Lloret e Ferreira, 2015). A redução da administração de L-DOPA pode amenizar a discinesia de pico de dose, entretanto leva a piora do parkinsonismo (Chen et al, 2020). A discinesia fora do período geralmente aparece no início da manhã ou à noite, quando o nível de L-DOPA de plasma é baixo, e se manifesta como espasmos dolorosos no pé ou na perna (Chen et al, 2020). A discinesia difásica é menos comum entre esses três tipos, ocorre no início e deslocamento do efeito da L-DOPA com níveis de levodopa de plasma subindo e caindo e em alguns casos graves, as pernas dos pacientes podem apresentar movimentos repetitivos e estereotipados, comportando-se como o balismo (Cenci, Ohlin e Odin, 2014; Rascol, Perez-Lloret S, Ferreira JJ, 2015).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da LID destaca-se: a idade no início da doença, sendo que nos pacientes com início de DP entre 40-50 anos de vida, cerca de 50% desenvolvem LID após o tratamento L-DOPA, número que é reduzido para 26% quando o início da doença se dá após os 60 anos, e para 17% em pacientes com mais de 70 anos (Tran et al, 2018) A duração e a dose do tratamento com L-DOPA também afeta fortemente a prevalência de LID. Estudos indicam que em tratamentos com doses superiores a 400 mg/dia o risco de desenvolver LID seria significativamente alto (Warren Olanow et al. 2013). Além disso, a LID parece ser mais comum em mulheres do que em homens. No entanto, tais observações também estiveram associadas ao impacto do peso corporal e dos níveis de L-DOPA plasmática (Matarazzo, Perez-Soriano, Stoessl, 2018). Portanto, os efeitos de gênero na LID ainda não foram claramente determinados.

Existem ainda muitas lacunas quanto ao conhecimento da fisiopatologia da LID, mas há alguns fenômenos que podem estar envolvidos na geração desses movimentos anormais involuntários. A discinesia tem sido associada a uma sequência de eventos que incluem estimulação pulsátil de receptores de dopamina e anormalidades em sistemas transmissores não dopaminérgicos (Cenci, 2014; Chen et al, 2020). Todos esses eventos podem causar alterações nos padrões de disparo neuronal, e resultar em desinibição excessiva de neurônios talamocorticais e superativação de áreas motoras corticais.

Evidências mostraram que a ativação do receptor D1 está intimamente associada ao desenvolvimento da LID (Espay et al, 2018). Estudos indicam que agonistas de receptores D1 podem induzir o aparecimento da LID, enquanto o esgotamento genético do gene do receptor D1 ou o bloqueio farmacológico da atividade deste receptor reduziria, em grande parte, a LID (Solís e Moratalla, 2018). A atividade aumentada de receptores D1 pode desencadear a

liberação de GABA por neurônios estriatais (Rangel-Barajas et al, 2011), o que inibe disparos de neurônios da SNr e causa severa discinesia (Keifman et al, 2019).

Além do sistema dopaminérgico, sabe-se também que outros sistemas de neurotransmissores estão envolvidos na ocorrência da discinesia, como por exemplo o sistema glutamatérgico. Tem sido encontrado um padrão de expressão patológica de receptores de glutamato em ratos e macacos discinéticos, bem como em pacientes com DP, onde há níveis aumentados da subunidade do receptor GluN2A e níveis diminuídos da subunidade GluN2B (Sebastianutto e Cenci, 2018; Chen et al, 2020).

Mais recentemente, a neuroinflamação também foi reconhecida como uma característica da LID (Aron-Badin et al., 2013; Boi et al., 2019; Bortolanza et al., 2015a e b; Del-Bel et al; 2016; Muñoz et al., 2014; Teema et al., al., 2016).

### **1.3 Neuroinflamação**

O termo "neuroinflamação" define amplamente uma cascata de processos inflamatórios que afetam o SNC (DiSabato, Quan e Godbout, 2016). Mecanismos neuroinflamatórios contribuem tanto para o desenvolvimento cerebral normal quanto para eventos neuropatológicos, como a neurodegeneração, incluindo a DP. Não se sabe, no entanto, se os processos neuroinflamatórios são uma causa ou uma consequência da degeneração neuronal (Tansey e Goldberg, 2009).

Em 1988, McGeer et al. foram os primeiros a observar, em cérebros de pacientes com DP (*post mortem*), processos inflamatórios nas áreas onde ocorreram morte de neurônios dopaminérgicos (ativação microglial na SN).

As células da glia são as células mais numerosas e amplamente distribuídas no SNC. Interação com neurônios e células do sistema imune, bem como com vasos sanguíneos (Yang e Zhou, 2019), e são classificadas em dois grupos: macroglia e microglia.

Micróglia é o tipo celular residente no SNC que possui capacidade fagocítica e é a principal forma de defesa imune ativa no sistema (Somjen, 1988). Essas células preservam muitos antígenos celulares presentes em macrófagos e monócitos (Ransohoff e Cardona, 2010). Além das funções imunológicas, a micróglia interage com vários tipos de células do SNC e regula vários processos funcionais e de desenvolvimento, incluindo a poda sináptica (von Bartheld, Bahney e Herculano-Houzel, 2016; Allen e Lyons, 2018). A ativação da micróglia tem papel chave nos processos neuroinflamatórios pois constitui a primeira linha de defesa quando ocorre uma injúria ou doença no tecido nervoso (Glass et al., 2010; Block e

Hong, 2005; Wolf et al., 2017). Estas células escaneiam ativamente o SNC para identificar a modificação da homeostase e se comportam de maneira adequada, associando atividades de defesa e de neuroproteção (Verkhratsky e Butt, 2013). Esse processo é caracterizado por uma mudança morfológica; a micróglia deixa de ser uma célula ramificada e passa a ser uma célula amebóide (Wolf, Boddeke e Kettenmann, 2017).

A macroglia é constituída pelos oligodendrócitos (que formam a mielina), pelas células endoteliais (que revestem os ventrículos cerebrais) e pelos astrócitos (Jessen, 2004; Perea e Araque, 2005). Os astrócitos compõem cerca de 50% de toda massa cerebral, e são o tipo mais comum de célula da glia no SNC (Gee e Keller, 2005). Dentre as inúmeras funções dos astrócitos destaca-se: suporte trófico (Hof et al, 1999; Gee e Keller, 2005); tamponamento do meio extracelular (Simard e Nedergaard, 2004); remoção de excesso de diferentes neurotransmissores, incluindo dopamina (Jessen, 2004; Gee e Keller, 2005); indução e manutenção da barreira hematoencefálica (Nedergaard et al, 2003); suporte energético (Pellerin e Magistretti, 2004); sinaptogênese (Nedergaard et al, 2003; Jassen, 2004; Allen e Barres, 2005); modulação sináptica (Bezzi e Volterra, 2001; Newman, 2003); resposta imunológica (Gee e Keller, 2005); controle da microcirculação cerebral (Anderson e Nedergaard, 2003; Zonta et al, 2003), além de produzir várias moléculas neurotróficas, incluindo o fator neurotrófico derivado da glia (glial-derived neurotrophic factor – GDNF), o qual é especialmente importante para o desenvolvimento e sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos (Lin, 1993; Schaar, 1993).

Uma vez que o GDNF promove a sobrevivência e diferenciação dos neurônios dopaminérgicos (Lin et al., 1993) e a barreira hematoencefálica apresenta alterações em pacientes com DP (Cabezas et al., 2014; Gray e Woulfe, 2015), não é de surpreender que a perda de papéis normalmente coadjuvantes de astrócitos (perda de função) esteja implicada no início e progressão da DP. Em contraste, os astrócitos reativos formados pela resposta a estímulos ou lesões no SNC promovem a patogênese de DP pelo ganho de função tóxica (Phatnani e Maniatis, 2015; Sofroniew, 2009). Estes astrócitos reativos liberam uma variedade de quimiocinas e citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e o beta interleucina-1 (IL-1 $\beta$ ), que são neurotóxicos (Lau e Yu, 2001; Leal et al., 2013). Ademais, frente a estímulos, os astrócitos tornam-se hipertróficos e acumulam filamento proteico intermediário, a proteína glial fibrilar ácida (GFAP – Dickson, 2012; Croisier e Graeber, 2006) que é constitutiva das células. Em cérebros de pacientes com DP foi descrito um

aumento no número de astrócitos (Damier et al., 1993) com uma forma distrófica (Braak et al., 2007), além de diferenças no grau de ativação de astrócitos (Teismann e Schulz, 2004).

O tratamento crônico com L-DOPA pode estar relacionado com a neuroinflamação que acontece na DP, visto que, de modo geral, os pacientes com DP estão sob tratamento com L-DOPA ou outro fármaco antiparkinsoniano no momento da morte (Gao et al., 2003; Cunningham et al., 2005, Bortolanza et al, 2015).

A administração de L-DOPA induz aumentos excessivos e transitórios de DA e glutamato, o que culmina não somente em estimulação constante e supra-fisiológica de receptores dopaminérgicos e glutamatérgicos, como também em um estado pró-inflamatório no estriado (Calon et al., 2003; Fabber e Kettenman, 2005; Meissner et al, 2006). Dessa forma, reduzir alterações inflamatórias pode ser uma maneira eficaz de reduzir a perda celular na DP, bem como de atenuar ou prevenir a LID.

De fato, resultados de estudos epidemiológicos mostraram que o uso de medicamentos anti-inflamatórios, especificamente anti-inflamatórios não esteroidais, reduz o risco de desenvolver DP (Noyce et al, 2012). Da mesma forma, drogas já utilizadas na clínica, com descrita ação anti-inflamatória, reduziram a perda dopaminérgica e atenuaram a LID em modelos de DP, como é o caso do canabidiol (Lastres et al, 2005, Junior et al., 2020) e a doxiciclina (DOX; Lazzarini et al., 2013; Bortolanza et al., 2021).

#### **1.4 Tetraciclinas**

A tetraciclina foi descoberta em 1948 por Benjamin Duggar, e é produto natural de fermentação da bactéria *Streptomyces aureofaciens*, encontrada no solo. As tetraciclinas são um grupo de antibióticos com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, extensivamente estudadas quanto a seus efeitos anti-neurodegenerativos (Blum et al., 2004; Forloni et al., 2009; Noble et al., 2009a, b; Ruzza et al., 2014; Stoilova et al., 2013) e suas ações em doenças neuropsiquiátricas (Keller et al., 2013). Estes fármacos têm várias funções de proteção cerebral (Gordon et al., 2012; Moon et al., 2012), incluindo a redução de processos neuroinflamatórios (Gordon et al., 2012; Noble et al., 2009a, b; Nordstrom et al., 1998; Sultan et al., 2013), e inibição da progressão de tumores (Amin et al. 1997) e da indução angiogênica (Furst 1998).

Atualmente há três grupos de tetraciclinas: tetraciclinas produzidas naturalmente, compostos semissintéticos de tetraciclina e tetraciclinas quimicamente modificadas (Golub et al. 1992; Nelson 1998; Swamy et al. 2015). Em termos de estrutura, todas as tetraciclinas

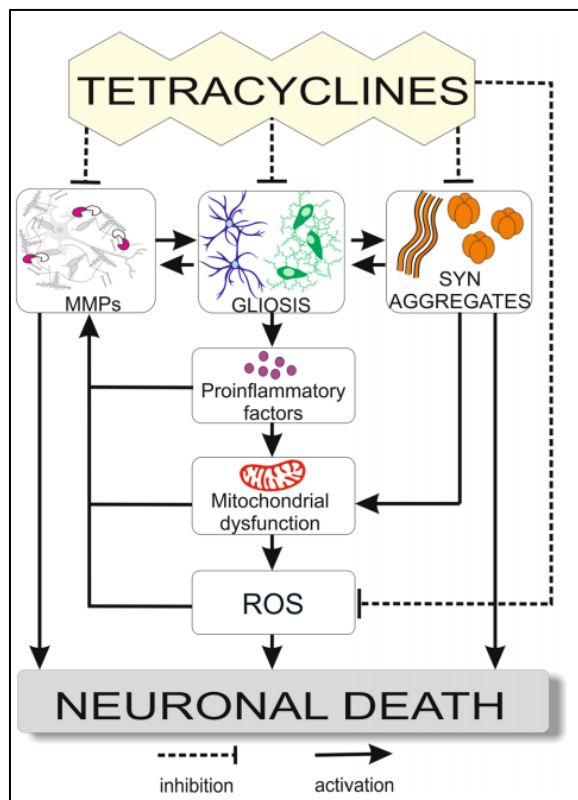
apresentam um núcleo tetracíclico linear, o que está intimamente relacionado com sua atividade antibacteriana. A estrutura dos anéis é cercada por zonas periféricas inferiores e superiores, que possuem diferentes grupos químicos funcionais, responsáveis por determinar cada exemplar (Martin, 1985).

As tetraciclinas semissintéticas de segunda geração são dentre outras, a doxiciclina (6-deoxy-5-hydroxytetracycline) e a minociclina (MIN - 7-dimethylamino-6-demethyl-6-deoxytetracycline [Blackwood et al., 1961; Stephens et al., 1963]). DOX e MIN se caracterizam pela redução da toxicidade, alta atividade antibacteriana, meia-vida longa, fácil penetração na barreira hematoencefálica (Domercq e Matute, 2004), e absorção rápida e completa, mesmo em indivíduos idosos (Sande e Mandell, 1985).

As tetraciclinas são utilizadas para o tratamento de *acne vulgaris*, rosácea e doença periodontal, sendo eficientes sem acarretar efeitos colaterais graves na saúde do paciente, o que sugere a segurança da antibióticoterapia (Skidmore et al. 2003; Smith e Leyden, 2005; Del Rosso, 2015). Curiosamente, Egeberg et al. (2016) relataram que o aumento do uso de tetraciclina no tratamento da rosácea está associado a uma pequena, porém significativa redução do risco de desenvolvimento da DP, o que sugere que as tetraciclinas têm potencial para o tratamento da DP.

Os efeitos neuroprotetores da DOX, em estudos pré-clínicos da DP, foram demonstrados tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Cho et al., 2011; Lazzarini et al., 2013). Aparentemente são resultantes de mecanismos que envolvem a inibição de metaloproteinases da matriz (MMPs; Cho et al., 2011), diminuição da ativação glial e de espécies reativas de oxigênio (Figura 4; Bortolanza et al., 2018). Trabalhos do nosso grupo, em um modelo de DP induzido por 6-OHDA, mostram que a DOX tem um efeito protetor em neurônios dopaminérgicos de camundongos (Lazzarini et al., 2013) e essa neuroproteção foi associada com a redução de atividade da micróglia e de astrócitos, ações estas corroboradas por outros estudos (Santa-Cecília et al., 2016; Sultan, Gebera e Toni, 2013). Outros trabalhos do nosso grupo, mostram que a DOX diminui o número e o tamanho de inclusões de alfa-sinucleína *in vitro* (Dominguez-Meijide et al., 2021), bem como induzir a redistribuição de agregados alfa-sinucleína em *Caenorhabditis elegans* (Dominguez-Meijide et al., 2021), além de atenuar a LID em ratos hemiparkinsonianos sem modificar a ação benéfica da L-DOPA (Bortolanza et al. 2021)

Figura 4: As tetraciclinas podem proteger contra a morte celular neuronal



A ação das tetraciclinas se dá por meio da supressão direta da expressão de MMPs e ativação de células gliais, remodelamento de agregados precoces de  $\alpha$ -sinucleína e eliminação de ROS. Indiretamente, a DOX é capaz de inibir a disfunção mitocondrial e subsequente dano oxidativo causado por agregados de  $\alpha$ -sinucleína ou produção de mediadores pró-inflamatórios a partir da ativação de células gliais, que, por sua vez, leva à ativação de MMP. Metaloproteinase de matriz: MMP, espécies de oxigênio reativas: ROS, SYN:  $\alpha$ -sinucleína. Retirada de Bortolanza et al., 2018.

Considerando a importante participação da neuroinflamação, em especial da resposta glial, na fisiopatologia da DP e LID, a escassez de estudos que investiguem processos neuroinflamatórios na Substância Negra, na discinesia induzida por L-DOPA e o efeito neuroprotetor e antidiscinético da DOX, hipotetizamos que a reversão e/ou prevenção do aparecimento da discinesia induzida por L-DOPA pela DOX seja, em parte, por modulação do perfil de astrócitos na Substância Negra.



## 2. Objetivos

---

## **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste estudo foi analisar o efeito do tratamento crônico com L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos e sua associação com terapia aguda e crônica com a DOX, sobre astrócitos presentes na Substância Negra.

## **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Analisar em animais hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA e apresentando discinesia, o número de astrócitos, quantificando as células imuno-positivas para a Proteína Ácida fibrilar glial (GFAP) na Substância Negra;
2. Analisar em animais hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA e em animais hemiparkinsonianos tratados com L-DOPA e doxiciclina, o número de astrócitos, quantificando as células imuno-positivas para a Proteína Ácida fibrilar glial (GFAP) na Substância Negra. O número de astrócitos foi analisado após administração da doxiciclina em animais parkinsonianos com discinesia estabelecida e após administração em animais parkinsonianos concomitante de doxiciclina e L-DOPA, desde a primeira dose. A doxiciclina diminuiu a discinesia induzida por L-DOPA em ambos os tratamentos

### **3. Materiais e métodos**

---

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Consumíveis utilizados

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

<b>Tipo</b>	<b>Fabricante</b>
Agulha descartável 30G	BD Precision Glide
Lâmina	Knittel Glass
Lamínula	Knittel Glass
Luva	Supermax
Pipeta Pasteur	RBR
Ponteiras 10 $\mu$ , 200 $\mu$ , 1000 $\mu$ , 5ml e 10ml	Axygen
Seringa descartável	BD Plastipak
Tubo eppendorf 200 $\mu$ , 2ml, 5ml e 10ml	Eppendorf
Tubo 36muno- 15ml e 50ml	Greiner

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 3.1.2 Equipamentos

Tabela 2: Lista de equipamentos utilizados para a realização dos experimentos.

<b>Tipo</b>	<b>Modelo</b>	<b>Fabricante</b>
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

Fonte: elaborado pelo autor.

#### 3.1.3 Tampões e soluções

Foram preparados os seguintes tampões e soluções:

- BSA 2%
  - 2g de BSA
  - 100ml de tampão A
- HCl 23%
  - 115mL de HCl
  - 385mL de H<sub>2</sub>O
- Complexo AB
  - 1 $\mu$ l de A ou B
  - Para cada
  - 300 $\mu$ l de tampão A
- PBS (pH 7,4)
  - NaCl -1,37mM
  - KCl- 27mM
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-100mM

- |  |   |
|--|---|
| <p>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-18mM</p> <p>➤ PFA 4% em PBS (pH 7,4)</p> <p>Paraformaldeído 4 % (p/v)</p> <p>➤ Solução anti-congelante</p> <p>PB0,2M- 125ml</p> <p>H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>- 125ml</p> <p>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>- 0,46 mM</p> <p>Etilenoglicol-150ml</p> <p>➤ Solução fixadora Somogi-Takagi (2l)</p> <p>100ml de PFA 8% (feito em PB 0,1M)</p> <p>4ml de glutaraldeído 25%</p> <p>300ml de ácido pícrico</p> <p>Completar para 2000ml com PB 0,1M</p> <p>➤ Solução sacarose</p> <p>C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>- 30% (p/v)</p> <p>PB 0,1M</p> <p>➤ Soro 5%</p> <p>5µl de soro goat</p> <p>100µl de tampão A</p> <p>➤ Tampão A (4l, pH 7,4)</p> <p>8,93g de fosfato monobásico</p> | <p>116g de fosfato dibásico</p> <p>36g de NaCl</p> <p>Quantidade suficiente para (qsp) para 4000 ml, com água destilada</p> <p>Conferir o pH, que deve ser 7,4</p> <p>Retirar 6 ml da solução e acrescentar 6 ml de triton X100.</p> <p>➤ Tampão citrato de sódio (1000ml, pH 6,0)</p> <p>0,378g ácido cítrico</p> <p>2,41g citrato de sódio</p> <p>qsp para 1000 ml, com água destilada</p> <p>conferir o pH, que deve ser 6,0</p> <p>➤ TBS 0,25M (1l, pH 7,4)</p> <p>250mL de TBS 1M (conferir o pH que deve estar igual a 7,4)</p> <p>750mL de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></p> <p>➤ TBS 1M (1l, pH 7,4)</p> <p>120g de trizma base (tris[hydroxymetyl]aminomethane)</p> <p>36g de NaCl</p> <p>Ajustar o pH com HCl a 23%</p> <p>qsp para 1L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub></p> |
|--|---|

#### 3.1.4 Drogas:

- 2,2,2-Tribromoetanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): 250 mg·kg<sup>-1</sup>, aplicado via intraperitoneal;
- 6-Hidroxidopamina (6-OHDA – Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): 2,5 µg·µl<sup>-1</sup> diluído em salina 0,9%, suplementado com ácido ascórbico de 0,02%, 1 µl·min<sup>-1</sup>;
- Apomorfina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA): 0,5 mg·kg<sup>-1</sup> diluído em salina 0,9%, aplicado via subcutâneo;

- Doxicilina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA): 40 mg·kg<sup>-1</sup> diluído em salina 0,9%, aplicado via intraperitoneal.
- L-DOPA (Prolopa dispersível, Hoffman-La Roche, Brasil): contendo 5 mg·kg<sup>-1</sup> de Cloridrato de Benserazida-HCL foi diluída em salina 0,9% e aplicada via oral (gavagem) na dose de 20 mg·kg<sup>-1</sup>;

### 3.2 Métodos

Neste estudo foram utilizadas secções de tecido obtidas no estudo desenvolvido por Bortolanza, Nascimento et al (2021). Estudamos o trabalho, e apresentamos a versão pessoal dos Métodos e dos Resultados. Estes estão apresentados no ANEXO 1.

#### Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica é uma técnica que detecta a ligação específica entre um anticorpo e antígeno para localizar antígenos específicos em células e tecidos (Magaki et al., 2019). Uma vez que ocorra a ligação antígeno-anticorpo, ela pode ser demonstrada por uma reação colorida visível em microscópio óptico (Ramos-Vara, 2005). A reação foi realizada seguindo o seguinte protocolo:

#### 1º dia:

**Passo 1. Lavagem com tampão A.** A fim de evitar falso positivo, o aparecimento de coloração de “fundo” ou marcações inespecíficas, é necessário que pontos suscetíveis a atrair proteínas sejam inibidos ou anulados. Para que isso ocorra, nós utilizaremos uma mistura de tampão fosfato-salino (PBS – vem do inglês “phosphate buffered saline”), usado para lavagem e diluição de soros, com um detergente (nesse caso o triton X100), a qual é conhecida como tampão A (Ramos-Vara, 2005). Foram feitas 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

**Passo 2. Recuperação antigênica com tampão citrato.** A recuperação antigênica tem a finalidade de recuperar antígenos que foram obstruídos pela fixação com formol, e é feita em altas temperaturas (Shi, Cote e Taylor, 2001). A solução de tampão citrato 0,1M a pH 6,0 é a mais utilizada para essa recuperação. Devem ser feitos 2 banhos com o tampão citrato, sendo o primeiro com duração de 5 minutos e em temperatura ambiente, e o outro com duração de 30 minutos a 70°. Em seguida, o tecido deve ser mantido em constante e leve agitação, até que atinja temperatura ambiente.

**Passo 3. Lavagem com tampão A.** Fazer 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

**Passo 4. Bloqueio da peroxidase endógena, por 30 minutos.** A técnica de imunoperoxidase é comumente usada para a caracterização antigênica de células e tecidos. No entanto, a ocorrência de células endógenas que são positivas para a peroxidase é frequente, o que dificulta tal avaliações (Malorny e Bildau, 1988). Em alguns casos, é impossível distinguir entre essas células e células coradas com anticorpos, por isso, é necessário bloquear as peroxidases endógenas. O bloqueio da peroxidase endógena é feito por uma mistura de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,5% e tampão A. Para saber a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> correspondente a 0,5% usa-se a fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$
$$30\% \times V_1 = 0,5 \times V_2$$

Onde:

C<sub>1</sub> = Concentração inicial

V<sub>1</sub> = Volume inicial

C<sub>2</sub> = Concentração final

V<sub>2</sub> = Volume final

**Passo 5. Lavagem com tampão A.** Fazer 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

**Passo 6. Bloqueio do BSA 2% + Tampão A + Soro 5%, por 60 minutos** A marcação de fundo inespecífica (background), quando intensa, dificulta ou torna mesmo impossível a interpretação de reações imuno-histoquímicas fracas. Existem dois aspectos principais que podem ser causa de marcação de fundo: (1) a ligação inespecífica do anticorpo aos componentes teciduais, seja por ligações hidrofóbicas ou interações iônicas, (2) a presença de enzimas endógenas. O background pode também ser atribuído à presença de biotina endógena. Para reduzir a marcação inespecífica do anticorpo ao tecido é aconselhada a pré-incubação do tecido com soro normal. Em teoria, este bloqueio funciona uma vez que as proteínas no soro normal vão ocupar os locais no tecido que estão carregados, reduzindo desta forma a ligação inespecífica do anticorpo ao tecido. O soro normal utilizado deve ser da mesma espécie do anticorpo secundário, para que não interfira na reação imunológica que ocorre no procedimento de imuno-histoquímica. Outra forma de evitar este tipo de marcação inespecífica é a utilização de tampão de lavagem com detergente. O bloqueio da atividade das enzimas endógenas é também muito importante para reduzir a marcação inespecífica. A utilização de métodos imuno-histoquímicos que apresentam como marcador enzimas semelhantes às que existem no tecido (endógenas), podem gerar problemas de marcação

inespecífica, uma vez que as enzimas endógenas podem reagir com o substrato usado para localizar o marcador e levantar problemas de interpretação e falsos positivos (Lopes et al., 2016).

**Passo 7. Incubação com anticorpo primário** Os soros de anticorpos são desenvolvidos após a imunização de animais-alvos, dos quais os anticorpos produzidos são obtidos por via direta ou indireta (Vilches-More e Ramos Vara, 2005). Assim, existem dois tipos de anticorpos, policlonais e monoclonais.

Os soros de anticorpos policlonais são produzidos em diversas espécies animais, porém, mais comumente em coelho, cavalo, cabra e galinha (Ramos-Vara, 2005). Os soros policlonais, quando comparados ao monoclonais, tem a vantagem de serem mais propensos a identificar isoformas múltiplas (epítomos) da proteína alvo (Mighell, Hume e Robinson, 1998).

Já no caso da produção de anticorpos monoclonais, os animais recebem injeções com o antígeno purificado, e após a obtenção de uma resposta imune os linfócitos B (células produtoras de anticorpos) são colhidos no baço (Ramos-Vara, 2005). Devido a curta vida das células B, elas são fundidas com células de mieloma, em seguida é feita a seleção de hibridomas (célula híbrida que foi produzida) que tenham a especificidade desejada (Ramos-Vara, 2005). O hibridoma é uma célula imortal, que produz antígenos específicos para um único epítomo. A vantagem do soro monoclonal é a sua especificidade quando comparado ao policlonal (Ramos-Vara, 2005).

Nesse trabalho foram utilizados 2 anticorpos primários, ambos diluídos em tampão A (tabela 3).

Tabela 3: Lista de anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica

<b>Antígeno</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
<b>GFAP</b>	Coelho	1:1000	Dako
<b>TH</b>	Coelho	1:2000	Pel freez

Tabela 3: Lista de anticorpos primários utilizados na imuno-histoquímica

Especificações dos anticorpos primários:

-GFAP: A proteína glial fibrilar ácida (GFAP) é uma proteína cito esquelética ácida não solúvel. É o principal filamento intermediário dos astrócitos humanos, e pertence as proteínas do filamento intermediário da classe III. Acredita-se que seja importante na modulação da



motilidade e forma dos astrócitos, ao fornecer estabilidade estrutural ao processo astrocítico. Devido à sua especificidade e abundância, tornou-se o marcador mais comumente usado para astrócitos em estudos clínicos e básicos.

-TH: A enzima tirosina hidroxilase (TH) é considerada um passo limitante da conversão de tirosina em L-DOPA e é utilizada como marcadora de neurônios dopaminérgicos.

2º dia:

**Passo 1. Lavagem com tampão A.** Fazer 3 lavagens com duração de 5 minutos cada.

**Passo 2. Preparação e incubação com anticorpo secundário, 90 minutos.** O anticorpo secundário possui marcação, tem o seu sinal amplificado devido ao anticorpo primário, e a escolha depende da espécie e do isotipo (classe) de imunoglobulina que foi usado no anticorpo primário (Magaki et al., 2019). O anticorpo deve ser diluído no tampão A. A quantidade de solução em cada poço varia de acordo com a quantidade de secções.

Tabela 4: Lista de anticorpos secundários utilizados na imuno-histoquímica.

<b>Anticorpo primário</b>	<b>Anticorpo secundário</b>				
<b>Antígeno</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tipo</b>	<b>Fabricante</b>
GFAP	Coelho	Cabra	1:400	Biotinilado	Vector Labs
TH	Coelho	Cabra	1:300	Biotinilado	Vector Labs

Fonte: elaborado pelo autor.

**Passo 3. Lavagem com tampão A.** Fazer 3 lavagens com duração de 5 minutos cada.

**Passo 4. Incubação com o complexo avidina-biotina (AB) por 2 horas.** A avidina é uma glicoproteína extraída da clara de ovo que possui quatro sítios de ligação por molécula e apresenta alta afinidade por uma vitamina de baixa massa molecular chamada biotina. A avidina tem um sítio de ligação para a biotina e pode ser ligada, através de outros locais, a um anticorpo (biotinilado) ou qualquer outra macromolécula, como uma enzima, fluorocromos ou outro marcador (Polak e Van Noorden, 2003).

Um dos métodos mais comuns de avidina-biotina é o complexo AB (Ramos-Vara, 2005). Nesse caso o anticorpo secundário é biotinilado e usa-se como reagente um complexo de avidina misturada com biotina ligada com marcador apropriado (Ramos-Vara, 2005). A avidina e a biotina são deixadas reagir juntas por cerca de 30 minutos antes de serem

aplicadas, resultando na formação de um grande complexo com numerosas moléculas de marcador (Ramos-Vara, 2005).

**Passo 5. Lavagem com tampão A.** Fazer 3 lavagens com duração de 5 minutos cada.

**Passo 6. Lavagem com Tris Salina Tamponada (TBS) 0,25M – pH 7,4** Os tampões de lavagem são utilizados para remover os reagentes entre as diferentes etapas de protocolos de marcação 42muno-histoquímica. Esta solução ajuda a manter as características morfológicas dos anticorpos e dos seus epítomos, de forma a facilitar a ligação específica necessária numa 42muno- 42muno-histoquímica.

**Passo 7. Revelação com DAB por no máximo 10 minutos.** Diferentes cromogênios são usados na imuno-histoquímica como o amino etil carbazol (AEC – Hira et al., 2015, 2018; Shimizu et al., 2017) e 0 3,3'-diaminobenzidina (DAB – Breznik et al., 2018; Nanduri e Prabhark, 2018) que são convertidos em produtos finais insolúveis em água vermelho e marrom, respectivamente, pela enzima Horseradish Peroxidase (HRP – Chen, Cho e Yang, 2010; Kumar et al., 2015). Nesse trabalho foi utilizada reação com a DAB.

A DAB deve ser dissolvida em TB 0,1M, e em seguida filtrado com papel filtro. Quando estiver próximo de encubar adicionar 20µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%.

DAB (comprimido de 10mg)

- ❖ 20 mL de TBS 0,1M
- ❖ 1 comprimido de 10mg de DAB
- ❖ 20µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30%

**Passo 8. Lavar com TBS 0,25M** Fazer 3 lavagens, com duração de 5 minutos cada.

**Passo 9. Montagem das lâminas** Usar solução de montagem e deixar secar em temperatura ambiente.

**Passo 10. Diafanização** As lâminas foram colocadas em uma rede apropriada e mergulhadas em cada um dos tanques da bateria de desidratação, segundo a ordem:

Tabela 5: Soluções para diafanização e tempo em cada uma.

Solução	Tempo (min)
H <sub>2</sub> O	3
Álcool 70%	3
Álcool 95%	3
Álcool absoluto I	3
Álcool absoluto II	3
Xilol 1:1 (50% xilol + 50% álcool absoluto)	3

<b>Xilol I</b>	3
<b>Xilo II</b>	3

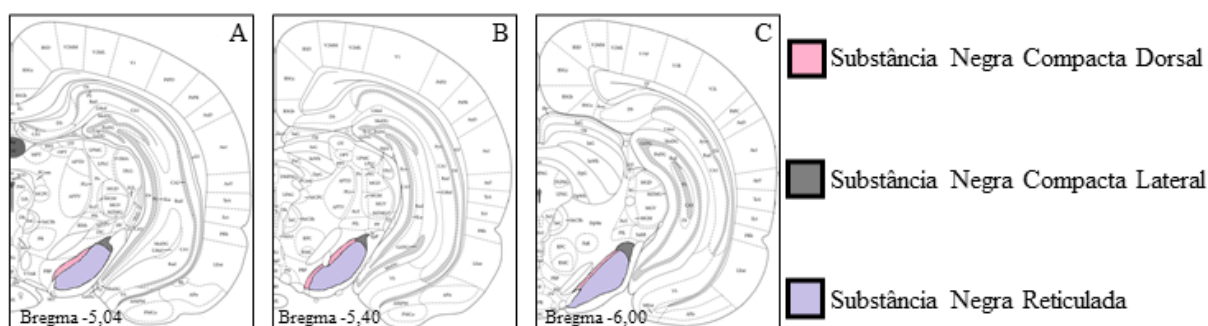
Fonte: elaborado pelo autor.

Após remoção das lâminas do xilol, as lamínulas foram adicionadas com Entelan e as lâminas prontas foram deixadas em temperatura ambiente por, no mínimo, 24 horas.

Análise e captura de imagens: Para fins de padronização, para cada imunohistoquímica a revelação de todas as lâminas foi realizada no mesmo ensaio, utilizando a mesma solução corante, além disso, foi considerado (i) uma área pré-fixada de 0,2 mm<sup>2</sup> em duas dimensões (2-D, eixo x-y), (ii) a escolha das áreas para análise foi realizada cuidadosamente, de maneira a garantir maior homogeneidade anatômica possível na amostragem, utilizando como referência o Atlas de PAXINOS & WATSON (1997; 2007), (iii) todo o processo de análise de imagens foi realizado às cegas.

Foram capturadas imagens tanto no lado ipsi quanto no lado contralateral a lesão, as análises foram feitas utilizando o programa Fiji Image J, e a SN foi dividida em três níveis de secção: rostral, medial e caudal (Fig. 7). A SN foi ainda subdividida em 3 regiões: SN compacta dorsal, SN compacta lateral e SN reticulada (Fig. 7).

Figura 5: Esquema mostrando os bregmas e as regiões selecionadas para quantificação de células GFAP+ na SN.



(A) Substância Negra rostral; (B) Substância Negra medial; (C) Substância Negra caudal. Adaptado de Paxinos e Watson, 2004

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 em um aumento de 20X e para astrócitos (GFAP) 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.

Quantificação de células: Foi realizado a contagem de células neuronais (análise semi-quantitativa) com marcação positiva na reação 44muno-histoquímica com anticorpo dirigido GFAP, com o auxílio do software Image J. Já na imuno-histoquímica com anticorpo dirigido para TH foi realizado uma análise qualitativa, apenas para confirmar a lesão, visto que não há marcação no lado ipsilateral a lesão.

Análise morfológica: A análise de modificações morfológicas foi feita por meio do plugin “Analyse Skeleton” do Fiji Image J. Este software marca todos os pixels, em uma imagem convertida em esqueleto, e conta todas as junções/intersecções, pontos de extremidade, ramificações e, por fim, mede o comprimento das ramificações.

A análise morfológica dos astrócitos foi baseada no descrito por Giocanti-Auregan et al. (2016 – Fig.8). 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 das ramificações. Os resultados foram expressos em números por mm<sup>2</sup> ou comprimento (μm) por mm<sup>2</sup>.

Figura 6: Protocolo de análise morfológica de células GFAP+.

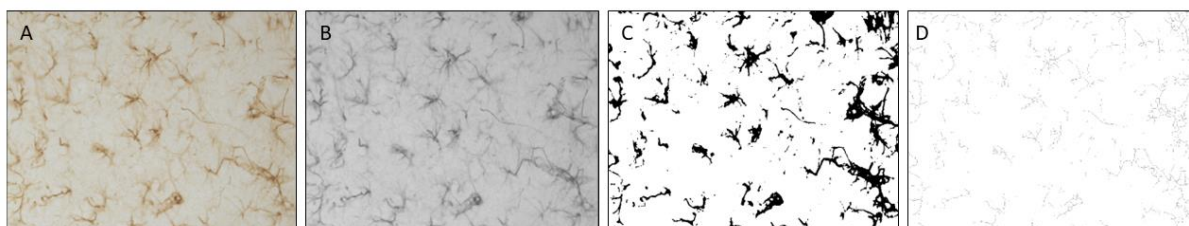


Ilustração dos processos utilizados no Fiji ImageJ para a análise da morfologia de astrócitos expressos na Substância Negra de ratos hemiparkinsonianos após o tratamento com L-DOPA, DOX ou salina. (A) Imagens capturadas no aumento de 40X; (B) Remoção dos ruídos de fundo; (C) Transformação em binários; (D) Transformação em esqueleto. Foi analisado a quantidade e o comprimento das ramificações. Fonte: elaborado pelo autor.

Análise estatística: O teste de Mann-Whitney investigou as diferenças entre os tratamentos na análise da discinesia. A ANOVA de uma via foi utilizada para análise do teste de rotação com o teste post hoc de Bonferroni. Uma ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni, foi realizada para analisar os resultados de 44muno-histoquímica.

O programa GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos e para as análises comportamentais e moleculares, os testes apropriados foram adotados conforme a criação dos grupos experimentais e respostas das análises. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

Calculamos o número amostral considerando testes pilotos realizados no laboratório para o estabelecimento do desvio padrão ou as frequências populacionais da variável. Utilizamos a seguinte fórmula para calcular o tamanho da amostra (n) para que se obtenha uma estimativa confiável da média populacional (de acordo com Miot, 2011 – J Vasc Bras 2011, Vol. 10, Nº 4):

$$n = \left( \frac{z_{\alpha/2} \cdot \sigma}{E} \right)^2$$

Onde:

n – tamanho da amostra;

$Z_{\alpha/2}$  – valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%);

$\delta$  – desvio padrão populacional da variável;

E = Diferença máxima estimada entre a média amostral e a verdadeira média populacional. É a margem de erro ou erro máximo de estimativa.

Para nosso desenho experimental, obtivemos o seguinte cálculo:

$n = (1,96 \times 8/5)^2 = 9,8$  (arredondamento para 10 ratos por grupo).

## **4. Resultados**

---

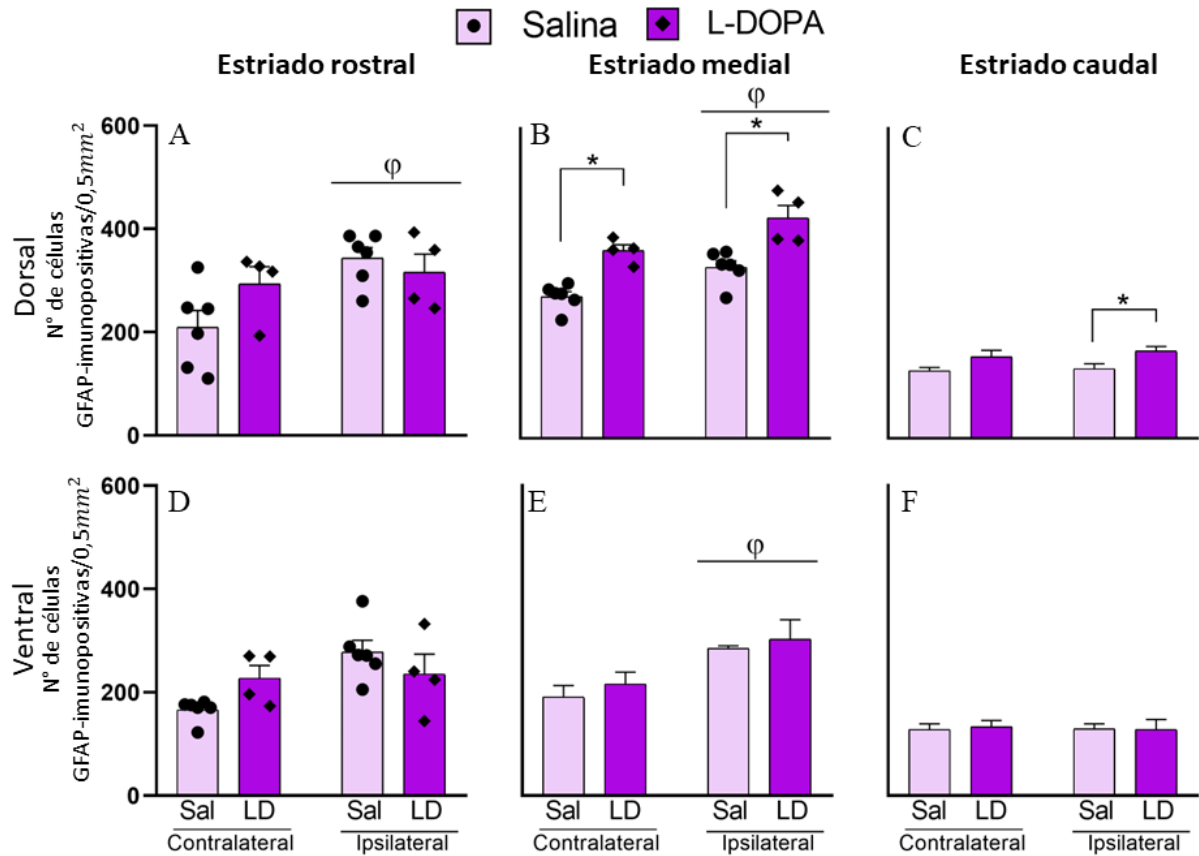
#### **4.1 Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre o número de células positivas para GFAP e sua morfologia no estriado e SN**

Bortolanza et al., (2015b) mostraram que o tratamento crônico de animais parkinsonianos com L-DOPA induz aumento de células GFAP+ no estriado lesionado de ratos. Não foi ainda elucidada a presença de células GFAP+ na SN de animais submetidos a tratamento similar. No presente estudo caracterizamos o número e morfologia celular de células GFAP+ no estriado e SN de animais parkinsonianos, apresentando discinesia induzida por L-DOPA e seus respectivos controles.

##### *4.1.1 Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre o número de células positivas para GFAP no estriado*

No estriado dos animais, na região dorsal, nível rostral ( $F_{(1,8)} = 9,193$ ;  $p = 0,0163$ ) e medial ( $F_{(1,8)} = 15,81$ ;  $p = 0,0041$ ) e na região ventral, nível medial ( $F_{(1,8)} = 13,75$ ;  $p = 0,0060$ ), foi encontrado um aumento no número de células GFAP-imunopositivas no lado ipsilateral à lesão, quando comparado ao número de células GFAP-imunopositivas no lado contralateral à lesão (figura 7). Na região dorsal do estriado, nível medial, foi observado aumento do número de células GFAP-imunopositivas dos animais tratados com L-DOPA em comparação àqueles que receberam somente salina, tanto no lado ipsi quanto no lado contralateral à lesão ( $F_{(1,8)} = 38,77$ ;  $p = 0,0003$ ; figura 7). Em nível caudal foi observado o aumento do número de células GFAP-imunopositivas no grupo tratado com L-DOPA quando comparado ao grupo tratado com salina ( $F_{(1,8)} = 20,24$ ;  $p = 0,0020$ ; figura 7) no lado ipsilateral à lesão.

Figura 7: Análise do número de células GFAP-imenopositivas em estriado de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.



O tratamento com L-DOPA promoveu, na região dorsal, em nível medial e caudal, aumento do número de astrócitos. (A) Estriado dorsal rostral; (B) Estriado dorsal medial; (C) Estriado dorsal caudal; (D) Estriado ventral rostral; (E) Estriado ventral medial; (F) Estriado ventral caudal. φ em comparação ao respectivo lado contralateral ( $p < 0,05$ ). \* em comparação ao respectivo grupo salina ( $p < 0,005$ ). ANOVA de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni, valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (barras). N = 4 – 6 por grupo. Sal: salina. LD: L-DOPA. Fonte: elaborado pelo autor.

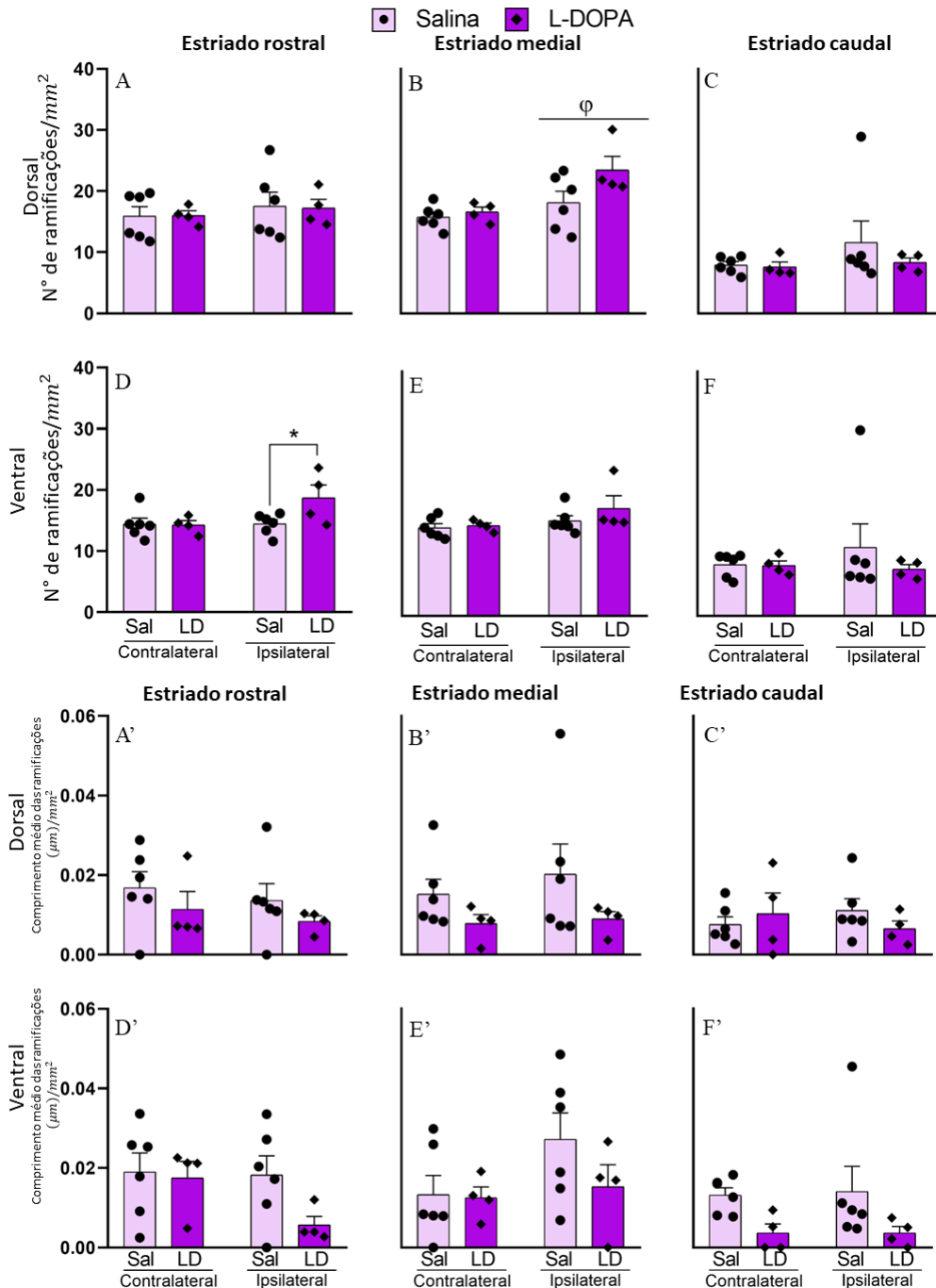
#### 4.1.2 Análise morfológica de células imunopositivas para a proteína GFAP no estriado após tratamento crônico com L-DOPA

Foi avaliado o número de ramificações e o comprimento médio das ramificações das células imunopositivas para a proteína GFAP. Na região dorsal do estriado, nível medial, houve aumento do número de ramificações das células no lado ipsilateral à lesão quando comparado ao lado contralateral à lesão ( $F_{(1,8)} = 13,93$ ;  $p = 0,0058$ ; figura 8). Também houve aumento no número de ramificações das células na região ventral, nível rostral, lado ipsilateral à lesão, no grupo de animais tratados com L-DOPA em comparação ao grupo tratado com salina ( $F_{(1,8)} = 2,659$ ;  $p = 0,1416$ ; figura 8).



Não foi observada diferença significativa no comprimento médio das ramificações nas regiões dorsal e ventral do estriado, nos níveis rostral, medial e caudal.

Figura 8: Análise morfológica de células GFAP-imunopositivas no estriado de ratos hemiparkinsonianos após tratamento crônico com salina ou L-DOPA.



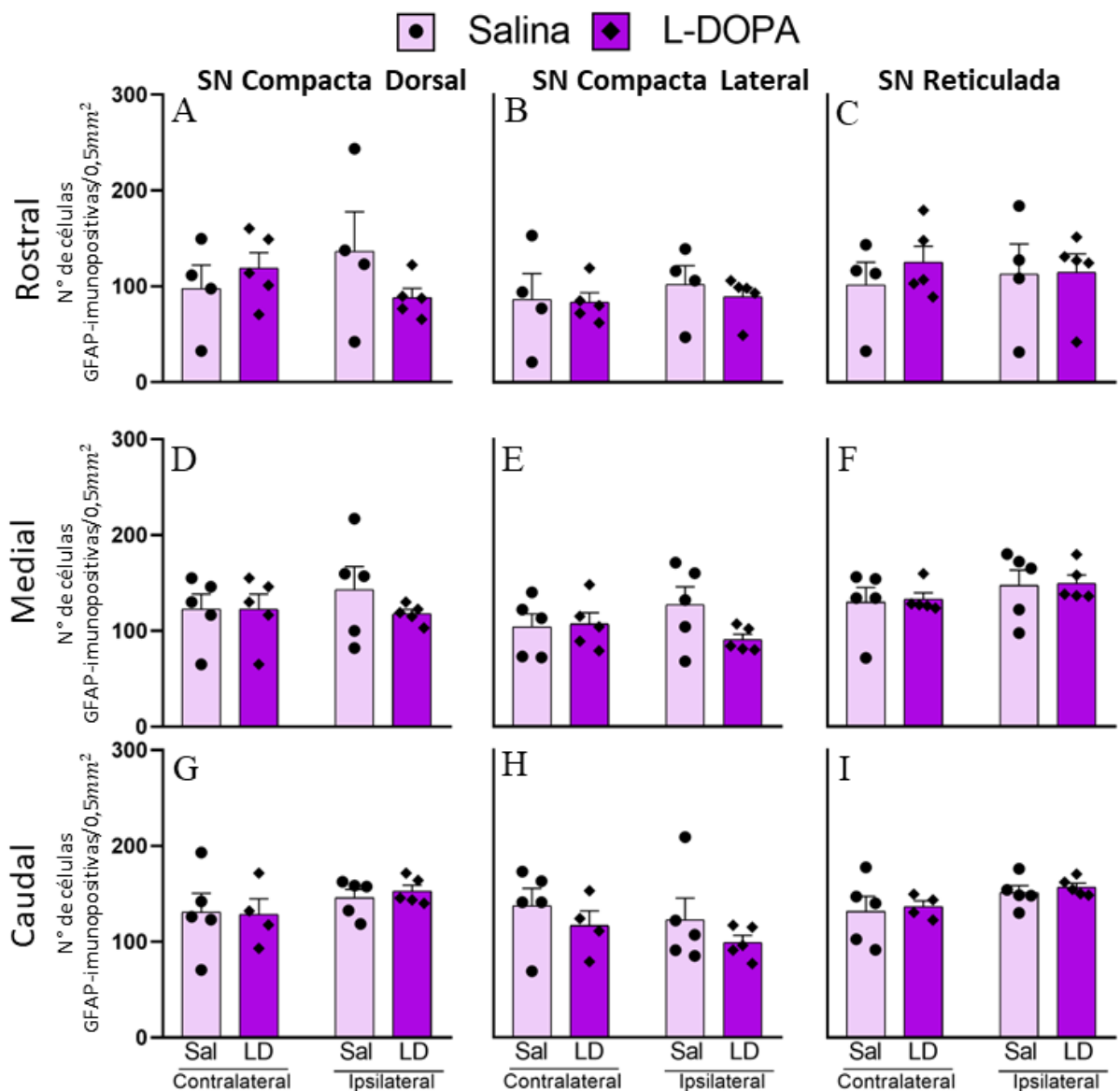
(A – F): Número de ramificações; (A' – F'): Comprimento médio das ramificações). Não foram encontradas diferenças significativas nem no número de ramificações, nem no comprimento médio das ramificações em nenhuma das regiões do estriado em nenhum dos níveis. (A e A'): Estriado dorsal rostral; (B e B'): Estriado dorsal medial; (C e C'): Estriado dorsal caudal; (D e D'): Estriado ventral rostral; (E e E'): Estriado ventral medial; (F e F'): Estriado ventral caudal. φ em comparação ao respectivo lado contralateral ( $p < 0,005$ ). \* em comparação ao respectivo grupo salina ( $p < 0,05$ ). ANOVA de duas vias seguido pelo teste de múltiplas

comparações de Bonferroni, valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (barras). N = 4 – 6 por grupo. Sal: salina. LD: L-DOPA. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.1.3 Efeito do tratamento crônico com L-DOPA sobre o número de células positivas para GFAP na substância negra

Na substância negra não foram encontradas diferenças na quantidade de células GFAP-imunopositivas nas regiões e nos níveis de secção analisados (figura 9).

Figura 9: Análise do número de células GFAP-imunopositivas em SN de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.



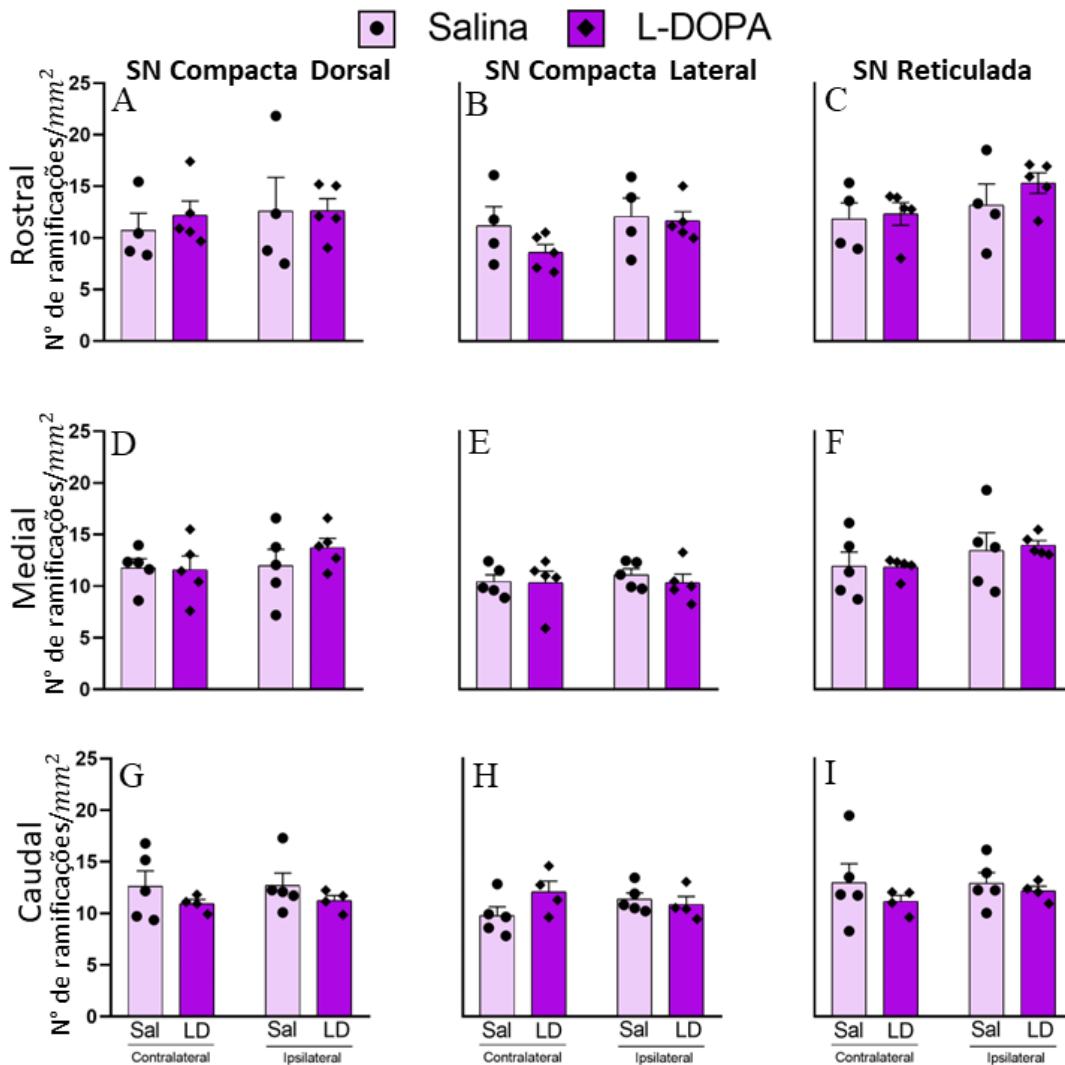
Não foram encontradas diferenças significativas em nenhuma das regiões analisadas. (A) Substância negra compacta dorsal rostral; (B) Substância negra compacta lateral rostral; (C) Substância negra reticulada rostral; (D) Substância negra compacta dorsal medial; (E) Substância negra compacta lateral medial; (F) Substância negra reticulada medial; (G) Substância negra compacta dorsal caudal; (H) Substância negra compacta lateral caudal; (I) Substância negra reticulada caudal. \* em comparação ao respectivo grupo salina ( $p < 0,005$ ). ANOVA de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni, valores apresentados em forma de

valores individuais (pontos) e mediana (barras). N = 4 – 6 por grupo. Sal: salina. LD: L-DOPA. SN: Substância Negra. Fonte: elabora pelo autor.

#### 4.1.4 Análise morfológica de células positivas para GFAP na substância negra após tratamento crônico com L-DOPA

O número de ramificações e o comprimento dos mesmos foram analisados para avaliação de morfologia das células GFAP+ na SN. Não foram observadas diferenças significativas no número de ramificações das células GFAP-imunopositivas entre os grupos e entre os lados analisados das regiões dorsal, lateral da SN reticulada (figura 10).

Figura 10: Análise morfológica (número de ramificações) de células GFAP-imunopositivas em SN de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.

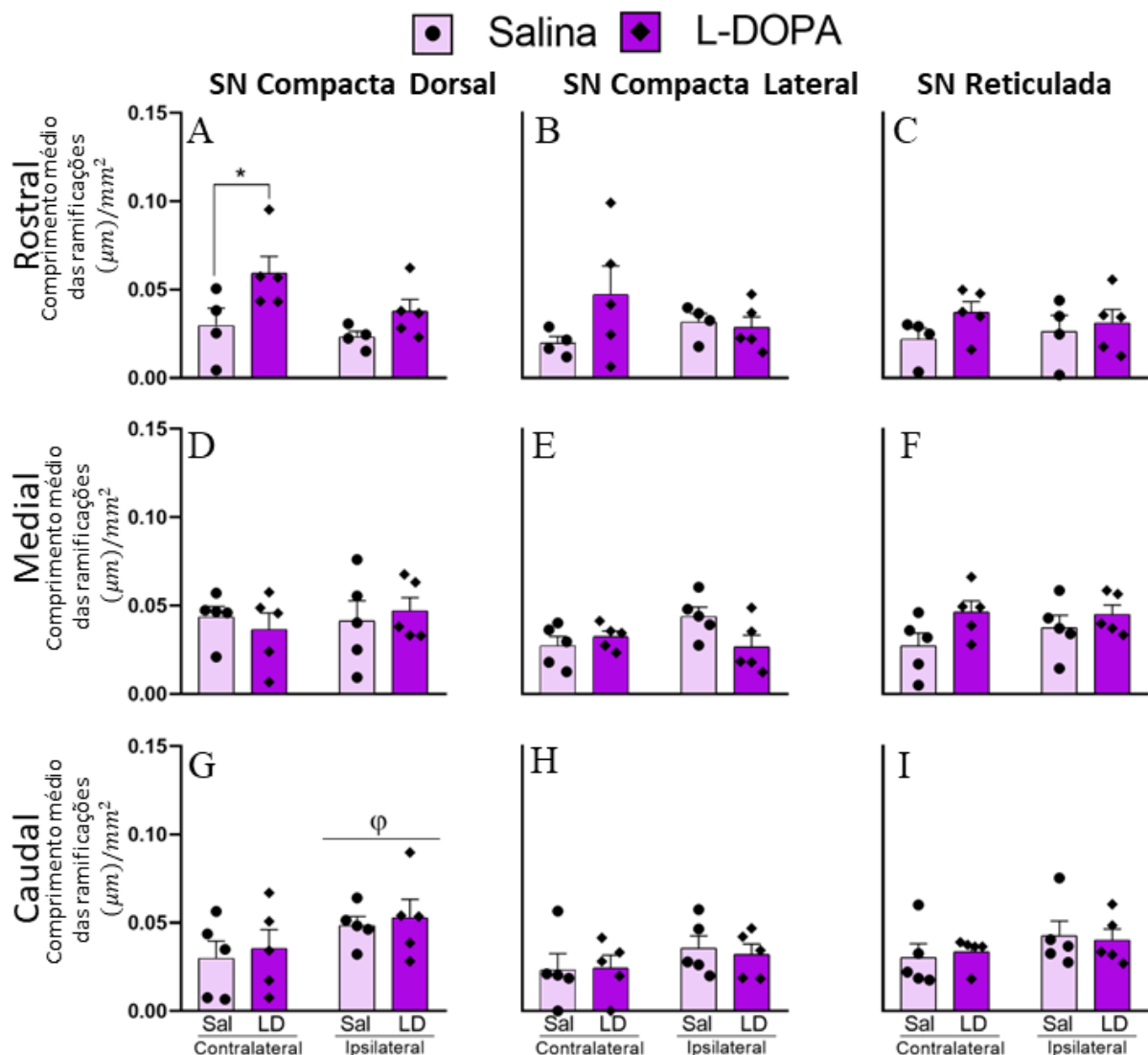


(A) Substância negra compacta dorsal rostral; (B) Substância negra compacta lateral rostral; (C) Substância negra reticulada rostral; (D) Substância negra compacta dorsal medial; (E) Substância negra compacta lateral medial; (F) Substância negra reticulada medial; (G) Substância negra compacta dorsal caudal; (H) Substância negra compacta lateral caudal; (I) Substância negra reticulada caudal. \* em comparação ao respectivo grupo salina (p < 0.05).

<0,05). ANOVA de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni, valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (barras). N = 4 – 6 por grupo. Sal: salina. LD: L-DOPA. SN: Substância Negra. Fonte: elaborado pelo autor.

Com relação ao comprimento médio das ramificações foi observado aumento na região da substância negra compacta dorsal, nível rostral, no lado contralateral à lesão, quando comparados os grupos L-DOPA e salina ( $F_{(1,7)} = 4,516$ ;  $p = 0,0415$ ; figura 11). Nessa mesma região, nível caudal, o comprimento médio das ramificações foi significativamente maior no lado ipsilateral a lesão quando comparado com o lado contralateral ( $F_{(1,8)} = 11,57$ ;  $p = 0,0093$ ; figura 11).

Figura 11: Análise morfológica (comprimento médio das ramificações) de células GFAP-imunopositivas em SN de animais hemiparkinsonianos tratados cronicamente com salina ou L-DOPA.

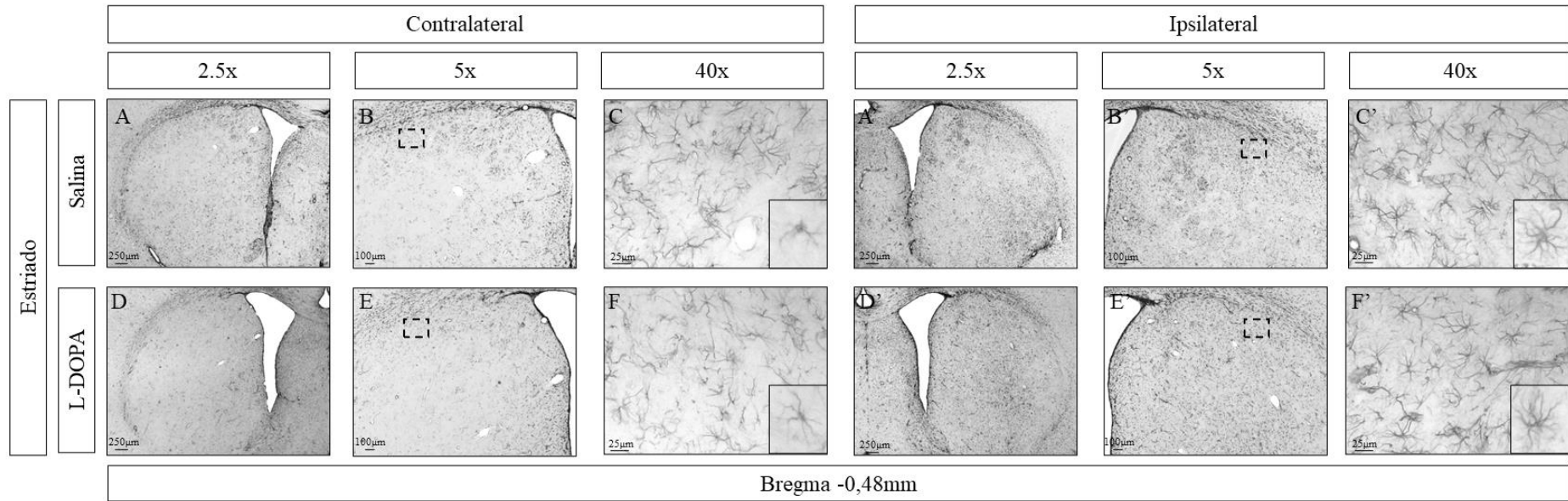


Foi encontrado um aumento na região da substância negra dorsal, em nível rostral, quando comparado o grupo L-DOPA com o grupo salina, e o comprimento médio das ramificações também foi significativamente maior em todo o lado ipsilateral a lesão quando comparado com o lado contralateral a lesão na região da substância negra

compacta dorsal em nível caudal; (B) Substância negra compacta lateral rostral; (C) Substância negra reticulada rostral; (D) Substância negra compacta dorsal medial; (E) Substância negra compacta lateral medial; (F) Substância negra reticulada medial; (G) Substância negra compacta dorsal caudal; (H) Substância negra compacta lateral caudal; (I) Substância negra reticulada caudal. \* em comparação ao respectivo grupo salina ( $p < 0,05$ ). ANOVA de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferrone, valores apresentados em forma de valores individuais (pontos) e mediana (barras). N = 4 – 6 por grupo. Sal: salina. LD: L-DOPA. SN: Substância Negra.

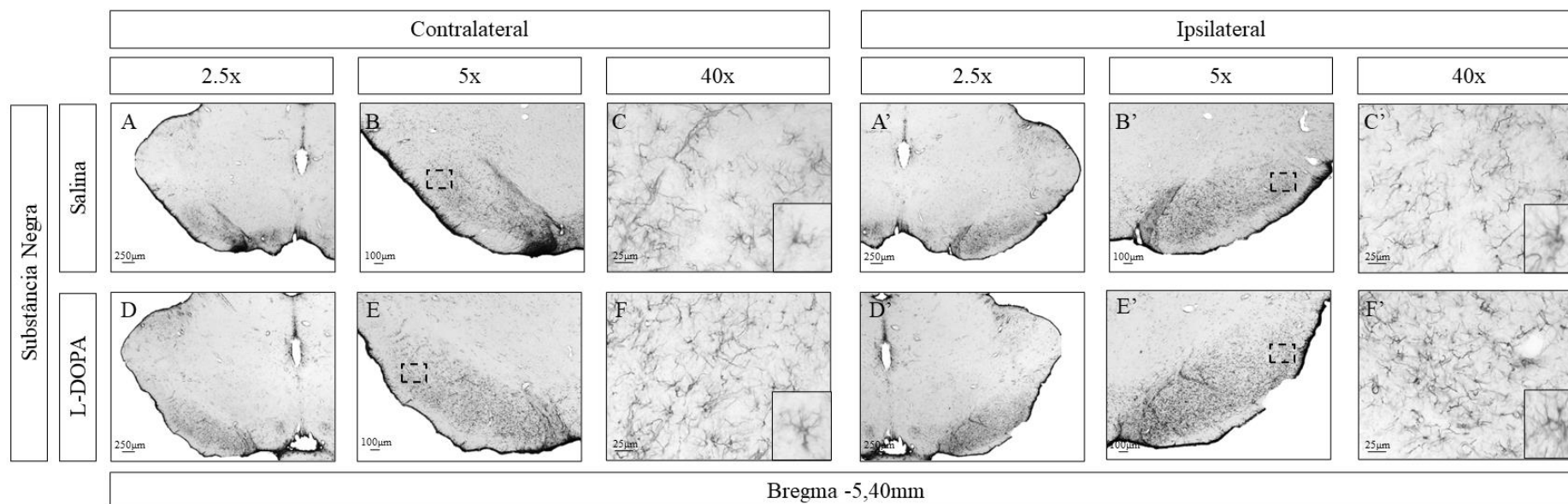
Na figura 12 são apresentadas fotomicrografias representativas da imunomarcação de GFAP no estriado. Na figura 13 são apresentadas fotomicrografias com imunomarcação da proteína GFAP na SN.

Figura 12: Fotomicrografias de secções coronais de estriados representando imunomarcção de GFAP.



(A, B e C) Secções com imunomarcção para GFAP no estriado medial contralateral a lesão grupo salina, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente; (A', B' e C') Secções com imunomarcção para GFAP no estriado medial ipsilateral a lesão grupo salina, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente; (D, E e F) Secções com imunomarcção para GFAP no estriado medial contralateral a lesão grupo L-DOPA, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente; (D', E' e F') Secções com imunomarcção para GFAP no estriado medial ipsilateral a lesão grupo L-DOPA, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente. Os quadrados do canto inferior direito nas figuras C, C', F e F' apresentam células GFAP imunopositivas em aumento de 63x.

Figura 13: Fotomicrografias de secções coronais de SN representando imunomarcção de GFAP.



(A, B e C) Secções com imunomarcção para GFAP na substância negra medial contralateral a lesão grupo salina, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente; (A', B' e C') Secções com imunomarcção para GFAP na substância negra medial ipsilateral a lesão grupo salina, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente; (D, E e F) Secções com imunomarcção para GFAP na substância negra contralateral a lesão grupo L-DOPA, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente; (D', E' e F') Secções com imunomarcção para GFAP na substância negra ipsilateral a lesão grupo L-DOPA, aumento de 2,5x, 5x e 40x, respectivamente. Os quadrados do canto inferior direito nas figuras C, C', F e F' apresentam células GFAP imunopositivas em aumento de 63x.

## **4.2 Efeito do tratamento agudo e crônico com doxiciclina sobre o número de células positivas para GFAP e sua morfologia na SN de animais hemiparkinsonianos com e sem discinesia induzida por L-DOPA**

Em um segundo momento foi realizada a reação para detecção imunocitoquímica da proteína GFAP na substância negra de ratos hemiparkinsonianos tratados com salina (Sal), cronicamente com salina e injeção única de DOX (DOXag), com salina e DOX de maneira crônica (DOXcr), com salina e L-DOPA (L-DOPA), cronicamente com L-DOPA e uma única injeção de DOX (DOXag+L-DOPA) e cronicamente com DOX e L-DOPA (DOXcr+L-DOPA).

### *4.2.1 Efeito do tratamento agudo e crônico com doxiciclina sobre células positivas para GFAP na SN compacta dorsal*

Na SNc dorsal, o lado ipsilateral à lesão, tanto no nível rostral ( $F_{(1,22)} = 8,242$ ;  $p = 0,0089$ ) quanto no nível caudal ( $F_{(1,25)} = 6,987$ ;  $p = 0,0140$ ), apresentou maior número de células GFAP-imunopositivas quando comparado ao lado contralateral (tabela 6, A).

Não houve diferença estatística no número de células GFAP+ entre os grupos e lados analisados a nível medial da SNc dorsal.

Na análise morfológica da SNc dorsal, nível medial, no lado ipsilateral a lesão, o número de ramificações das células GFAP positivas do grupo L-DOPA foi significativamente maior do que do grupo DOXcr ( $F_{(5,21)} = 3,073$ ;  $p = 0,0309$ ; tabela 6, B).

O comprimento médio das ramificações foi maior, no nível medial, em todos os grupos no lado ipsilateral a lesão quando comparado ao lado contralateral ( $F_{(1,21)} = 5,793$ ;  $p = 0,0254$ ; tabela 6, C).

Não houve diferenças morfológicas das células GFAP+ nos níveis rostral e caudal da SNc dorsal entre os grupos.



Tabela 6: Análise de células GFAP-imunopositivas em SN Compacta Dorsal.

A						
N° de células GFAP-imunopositivas/0,5mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral $\varphi$	Contra	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral $\varphi$
Sal	276 $\pm$ 47,52	302,2 $\pm$ 44,33	411 $\pm$ 21,01	369 $\pm$ 37,23	342,2 $\pm$ 36,62	328,2 $\pm$ 21,64
DOXag	221,7 $\pm$ 51,52	256 $\pm$ 50,14	335 $\pm$ 37,82	330,45 $\pm$ 3	338 $\pm$ 27,54	453,8 $\pm$ 54,21
DOXch	218,7 $\pm$ 3,283	320,7 $\pm$ 15,03	311,8 $\pm$ 47,09	364,8,63 $\pm$ 76	386 $\pm$ 58,19	413,3 $\pm$ 43,99
L-DOPA	253,2 $\pm$ 31,72	262 $\pm$ 19,15	285,2 $\pm$ 31,32	336,2,48 $\pm$ 97	275,8 $\pm$ 36,33	340,8 $\pm$ 18,45
DOXag+L-DOPA	285,9 $\pm$ 41,45	376 $\pm$ 53,17	312,8 $\pm$ 58,45	348,54 $\pm$ 6	334,5 $\pm$ 41,09	337,8 $\pm$ 40,06
DOXch+L-DOPA	239 $\pm$ 13,64	283,3 $\pm$ 63,65	272,6 $\pm$ 63,68	329,8 $\pm$ 56,39	307,3 $\pm$ 51,34	367,2 $\pm$ 51,41

B						
N° de ramificações/mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
Sal	15,85 $\pm$ 0,599	15,96 $\pm$ 2,674	20,07 $\pm$ 2,628	17,05 $\pm$ 1	16,55 $\pm$ 1,355	16,84 $\pm$ 2,558
DOXag	12,52 $\pm$ 2,609	13,09 $\pm$ 3,059	14,49 $\pm$ 0,4918	16,19 $\pm$ 1,703	15,24 $\pm$ 0,5895	16,3 $\pm$ 3,387
DOXch	18,51 $\pm$ 2,058	17,42 $\pm$ 2,159	18,48 $\pm$ 0,8099	19,77 $\pm$ 0,777	15,57 $\pm$ 0,4495	16,23 $\pm$ 2,22
L-DOPA	17,34 $\pm$ 1,327	15,4 $\pm$ 2,047	15,79 $\pm$ 1,182	14,22 $\pm$ 0,7076*	17,12 $\pm$ 1,6	15,14 $\pm$ 2,5194
DOXag+L-DOPA	18,91 $\pm$ 2,215	15,04 $\pm$ 0,2905	17,2 $\pm$ 1,13	18,61 $\pm$ 2,019	14,39 $\pm$ 1,677	15,88 $\pm$ 0,862
DOXch+L-DOPA	17,11 $\pm$ 2,346	18,67 $\pm$ 1,082	16,34 $\pm$ 1,539	15,98 $\pm$ 0,7401	15,07 $\pm$ 0,8869	15,09 $\pm$ 1,8229

C						
Comprimento médio das ramificações ( $\mu$ m)/mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	$\varphi$	Ipsilateral
Sal	0,5918	0,562	0,5489	0,5798	0,4517	0,4557
	$\pm$ 0,09764	$\pm$ 0,08333	$\pm$ 0,1063	$\pm$ 0,07153	$\pm$ 0,08893	$\pm$ 0,08896
DOXag	0,6549	0,4875	0,4426	0,5097	0,5198	0,6874
	$\pm$ 0,06309	$\pm$ 0,1857	$\pm$ 0,08655	$\pm$ 0,0507	$\pm$ 0,076	$\pm$ 0,04124
DOXch	0,527	0,6855	0,6	0,6348	0,7543	0,7424
	$\pm$ 0,0508	$\pm$ 0,1499	$\pm$ 0,04852	$\pm$ 0,08904	$\pm$ 0,04882	$\pm$ 0,04309
L-DOPA	0,618	0,7187	0,6853	0,8081	0,7297	0,8235
	$\pm$ 0,07436	$\pm$ 0,04439	$\pm$ 0,06889	$\pm$ 0,05612	$\pm$ 0,0093	$\pm$ 0,0621
DOXag+L-DOPA	0,617	0,7758	0,577	0,8334	0,8845	0,6683
	$\pm$ 0,1129	$\pm$ 0,1529	$\pm$ 0,1978	$\pm$ 1,015	$\pm$ 1,0126	$\pm$ 0,1808
DOXch+L-DOPA	0,5415	0,7549	0,5984	0,6735	0,5881	0,6344
	$\pm$ 0,05016	$\pm$ 0,08274	$\pm$ 0,07912	$\pm$ 0,07657	$\pm$ 0,07228	$\pm$ 0,03241

O lado ipsilateral a lesão possui um maior número de células GFAP-imunopositivas tanto em nível rostral quanto em nível caudal. Em nível medial, no lado ipsilateral a lesão, o grupo L-DOPA expressa um maior número de ramificações do que o grupo DOXcr, e todo o lado ipsilateral possui ramificações significativamente maiores do que o lado contralateral. (A) Número de células GFAP-imunopositivas/0,5mm<sup>2</sup>; (B) Número de ramificações/mm<sup>2</sup>. (C) Comprimento médio das ramificações ( $\mu$ m)/mm<sup>2</sup>.  $\varphi$  vs respectivo lado contralateral; \* vs respectivo grupo DOXch. Anova de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, valores apresentados em forma de mediana  $\pm$ erro padrão da média.

#### 4.2.2 Efeito do tratamento agudo e crônico com doxiciclina sobre células positivas para GFAP na SN compacta lateral

Na SNc lateral foram analisados o número de células GFAP-imunopositivas/0,5mm<sup>2</sup>, número de ramificações/mm<sup>2</sup> e comprimento médio das ramificações. Nos níveis rostral (F<sub>(1,22)</sub> = 4,888, p = 0,0377), medial (F<sub>(1,21)</sub> = 13,95, p = 0,0012) e caudal (F<sub>(1,25)</sub> = 20,44, p =

0,0001), lado ipsilateral a lesão, todos os grupos apresentaram um maior número de células GFAP-imunopositivas quando comparados ao seu respectivo lado contralateral (tabela 7, A).

A análise morfológica indicou maior número de ramificações das células GFAP+ no grupo L-DOPA, em nível medial da SNc lateral, no lado contralateral a lesão, comparado ao grupo DOXag ( $F_{(5,21)} = 1,652$ ,  $p = 0,1901$ ; tabela 7, B). O número de ramificações em todos os grupos do lado ipsilateral a lesão, da região caudal, foi significativamente maior do que do respectivo lado contralateral a lesão ( $F_{(1,24)} = 4,633$ ,  $p = 0,0416$ ; tabela 7, B).

Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos no comprimento das ramificações em nenhum dos níveis analisados na SNc lateral.

Tabela 7: Análise de células GFAP-imunopositivas em SN compacta lateral.

A						
N° de células GFAP-imunopositivas/0,5mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral $\phi$	Contralateral	Ipsilateral $\phi$	Contralateral	Ipsilateral $\phi$
Sal	287,8 ± 41,74	286,8 ± 15,74	312,8 ± 33,92	403,8 ± 45,49	329,8 ± 31,65	357,8 ± 22,58
DOXag	225,7 ± 35,1	238,7 ± 8,743	298 ± 36,74	333,5 ± 27,92	387,8 ± 20,65	477,8 ± 63,39
DOXch	253,3 ± 9,597	313,7 ± 42,33	344 ± 48,8	400,8 ± 56,76	389,7 ± 64,31	494 ± 57,04
L-DOPA	241,2 ± 23,52	279,2 ± 12,07	281,4 ± 17,21	336,4 ± 21,65	276,7 ± 31,16	361,5 ± 38,44
DOXag+L-DOPA	280,6 ± 24,04	344,3 ± 38,29	380,8 ± 59,34	381,8 ± 37,39	332,5 ± 47,43	402,5 ± 35,35
DOXch+L-DOPA	262,3 ± 48,01	285,5 ± 74,24	314,8 ± 67,69	425,4 ± 78,59	364,2 ± 48,04	408,8 ± 63,75

B						
N° de ramificações/mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral $\phi$
Sal	7,878 ± 0,6686	9,275 ± 1,718	8,312 ± 0,8251	8,011 ± 0,7766	7,611 ± 0,7671	9,193 ± 0,6554
DOXag	6,638 ± 0,5051	6,727 ± 1,123	6,026 ± 0,7897	7,889 ± 0,7824	6,487 ± 0,6164	7,959 ± 0,6451
DOXch	10,08 ± 1,472	7,363 ± 0,4701	9,162 ± 1,9882	9,631 ± 1,6137	9,265 ± 1,042	9,741 ± 1,6659
L-DOPA	6,288 ± 0,8166	8,051 ± 1,278	9,589 ± 0,6628*	6,708 ± 0,7358	7,38 ± 0,525	7,898 ± 0,6251
DOXag+L-DOPA	8,458 ± 1,566	6,589 ± 0,365	8,495 ± 1,469	7,89 ± 1,8439	7,856 ± 1,8067	7,814 ± 1,6051
DOXch+L-DOPA	8,028 ± 0,9999	8,223 ± 0,7475	7,97 ± 0,831	8,649 ± 0,4011	8,519 ± 0,9335	9,37 ± 0,6156

C						
Comprimento médio das ramificações ( $\mu$ m)/mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral
Sal	0,3229 ± 0,06741	0,1989 ± 0,04263	0,2686 ± 0,06183	0,3135 ± 0,07977	0,2297 ± 0,0289	0,2208 ± 0,03707
DOXag	0,2709 ± 0,03494	0,307 ± 0,09294	0,1341 ± 0,04487	0,2767 ± 0,06074	0,3414 ± 0,03809	0,3553 ± 0,0341
DOXch	0,195 ± 0,03123	0,2949 ± 0,04354	0,3476 ± 0,07247	0,2753 ± 0,02426	0,3362 ± 0,02245	0,3406 ± 0,04153
L-DOPA	0,3511 ± 0,05826	0,3166 ± 0,04653	0,3337 ± 0,04361	0,3521 ± 0,05278	0,3415 ± 0,04022	0,3784 ± 0,02797
DOXag+L-DOPA	0,287 ± 0,05261	0,3716 ± 0,0743	0,308 ± 0,1117	0,3078 ± 0,016	0,329 ± 0,06931	0,3046 ± 0,09616
DOXch+L-DOPA	0,2469 ± 0,01686	0,3063 ± 0,03586	0,2741 ± 0,02067	0,2942 ± 0,01569	0,3041 ± 0,01676	0,3072 ± 0,04247

O lado ipsilateral a lesão expressou um maior número de células GFAP-imunopositivas em todos os níveis de secção. Em nível medial, no lado contralateral a lesão, o grupo L-DOPA expressa um maior número de ramificações do que o grupo DOXag, e em nível caudal todo o lado ipsilateral possui ramificações significativamente maiores do que o lado contralateral. (A) Número de células GFAP-imunopositivas/0,5mm<sup>2</sup>; (B) Número de ramificações/mm<sup>2</sup>. (C) Comprimento médio das ramificações ( $\mu$ m)/mm<sup>2</sup>.  $\phi$  vs respectivo lado

contralateral; \* vs respectivo grupo DOXag. Anova de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, valores apresentados em forma de mediana  $\pm$ erro padrão da média.

#### *4.2.3 Efeito do tratamento agudo e crônico com doxiciclina sobre células positivas para GFAP na SN reticulada.*

No nível rostral, lado ipsilateral, como um todo, foi detectado maior número de células GFAP-imunopositivas ( $F_{(1,22)} = 25,55$ ,  $p < 0,0001$ ; tabela 8, A) e o maior comprimento médio das ramificações ( $F_{(1,22)} = 8,899$ ,  $p = 0,0069$ ; tabela 8, B). Entretanto não houve diferenças significativas com relação ao número de ramificações. No nível medial, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas no número de células GFAP-imunopositivas, o número de ramificações ( $F_{(1,21)} = 4,978$ ,  $p = 0,0367$ ; tabela 8, B) e o comprimento médio das ramificações ( $F_{(1,21)} = 8,248$   $p = 0,0091$ ; tabela 8, C) foi significativamente maior em todo o lado ipsilateral quando comparado ao lado contralateral. No nível caudal, todo o lado ipsilateral a lesão apresentou maior número de células GFAP-imunopositivas ( $F_{(1,25)} = 7,296$ ,  $p = 0,0122$ ; tabela 8, A) em comparação ao lado contralateral a lesão. Ainda no nível caudal, no lado ipsilateral à lesão o grupo DOXch apresentou maior número de células GFAP-imunopositivas ( $F_{(5,25)} =$  ,  $p = 0,0118$ ; tabela 8, A) em comparação ao grupo salina O comprimento médio das ramificações foi significativamente maior no grupo L-DOPA em comparação ao grupo salina ( $F_{(5,24)} = 2,513$   $p = 0,0241$ ; tabela 8, C).

Tabela 8: Análise de células GFAP-imunopositivas em SN reticulada.

A						
N° de células GFAP-imunopositivas/0,5mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral $\phi$	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral $\phi$
Sal	250,8 $\pm$ 45,72	350,5 $\pm$ 36,77	400 $\pm$ 44,77	395,8 $\pm$ 38,87	394,8 $\pm$ 36,76	334,2 $\pm$ 28,61
DOXag	227 $\pm$ 50,52	305 $\pm$ 45,4	366,5 $\pm$ 42,39	410 $\pm$ 40,33	458,2 $\pm$ 45,76	465,4 $\pm$ 38,31
DOXch	293,7 $\pm$ 34,07	398,3 $\pm$ 24,74	430,8 $\pm$ 62,76	483,4 $\pm$ 68,59	510 $\pm$ 24,76	597 $\pm$ 41,06 *
L-DOPA	266,2 $\pm$ 41,47	287,2 $\pm$ 30,66	318,2 $\pm$ 32,41	380 $\pm$ 42,67	317,5 $\pm$ 30,76	408,7 $\pm$ 36,14
DOXag+L-DOPA	298,4 $\pm$ 23,57	375,4 $\pm$ 38,32	360,8 $\pm$ 37,99	319,5 $\pm$ 25,07	367,5 $\pm$ 38,76	382,8 $\pm$ 38,24
DOXch+L-DOPA	335 $\pm$ 67,84	372,8 $\pm$ 65,64	357,2 $\pm$ 69,06	404,2 $\pm$ 67,73	447 $\pm$ 65,76	516 $\pm$ 52,07

B						
N° de ramificações/mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral	Contralateral	Ipsilateral $\phi$	Contralateral	Ipsilateral
Sal	35,46 $\pm$ 2,621	33,14 $\pm$ 2,624	36,81 $\pm$ 0,9422	39,68 $\pm$ 2,772	35,73 $\pm$ 2,486	37,58 $\pm$ 1,634
DOXag	27,36 $\pm$ 2,312	31,43 $\pm$ 1,588	30,01 $\pm$ 1,907	32,75 $\pm$ 1,734	31,12 $\pm$ 0,8778	35,99 $\pm$ 1,637
DOXch	36,82 $\pm$ 4,393	37,49 $\pm$ 3,676	34,67 $\pm$ 3,324	35,88 $\pm$ 1,354	34 $\pm$ 2,095	34,04 $\pm$ 1,529
L-DOPA	30,85 $\pm$ 1,55	29,56 $\pm$ 2,11	33,56 $\pm$ 1,732	32,97 $\pm$ 1,052	33,57 $\pm$ 1,97	32,73 $\pm$ 1,119
DOXag+L-DOPA	36 $\pm$ 3,107	31,76 $\pm$ 1915	33,39 $\pm$ 2,031	32,1 $\pm$ 0,8324	30,32 $\pm$ 2,852	31,45 $\pm$ 2,254
DOXch+L-DOPA	36,23 $\pm$ 3,687	36,4 $\pm$ 2,58	32,19 $\pm$ 1,307	38,98 $\pm$ 2,005	31,02 $\pm$ 1,645	34,15 $\pm$ 1,1

C						
Comprimento médio das ramificações ( $\mu$ m)/mm <sup>2</sup>						
Tratamento	Rostral		Medial		Caudal	
	Contralateral	Ipsilateral $\phi$	Contralateral	Ipsilateral $\phi$	Contralateral	Ipsilateral
Sal	1,03 $\pm$ 0,1044	1,155 $\pm$ 0,1896	1,152 $\pm$ 0,1328	1,321 $\pm$ 0,2066	1,108 $\pm$ 0,181	0,9944 $\pm$ 0,1773
DOXag	1,153 $\pm$ 0,0691	1,421 $\pm$ 0,2297	0,8805 $\pm$ 0,09112	1,139 $\pm$ 0,1646	1,234 $\pm$ 0,08952	1,381 $\pm$ 0,04599
DOXch	0,94 $\pm$ 0,1869	1,247 $\pm$ 0,2489	1,186 $\pm$ 0,1485	1,263 $\pm$ 0,05	1,536 $\pm$ 0,07857	1,525 $\pm$ 0,07978
L-DOPA	1,307 $\pm$ 0,2058	1,484 $\pm$ 0,2146	1,442 $\pm$ 0,2662	1,81 $\pm$ 0,1316	1,57 $\pm$ 0,1703	1,834 $\pm$ 0,1495 *
DOXag+L-DOPA	1,272 $\pm$ 0,2525	1,388 $\pm$ 0,2661	1,381 $\pm$ 0,2983	1,26 $\pm$ 0,4491	1,696 $\pm$ 0,239	1,568 $\pm$ 0,4582
DOXch+L-DOPA	1,243 $\pm$ 0,1458	1,466 $\pm$ 0,1341	1,234 $\pm$ 0,1699	1,322 $\pm$ 0,1219	1,209 $\pm$ 0,1127	1,189 $\pm$ 0,1118

O lado ipsilateral a lesão expressou um maior número de células GFAP-imunopositivas em nível rostral e caudal. Ainda em nível caudal, no lado ipsilateral a lesão o grupo DOXcr apresentou um maior número de células GFAP-imunopositivas em comparação ao grupo salina. Em nível medial, o lado ipsilateral a lesão expressou um maior número de ramificações e um maior comprimento médio das ramificações, em comparação ao respectivo lado contralateral. Em nível caudal, no lado ipsilateral a lesão, o grupo L-DOPA expressou um maior comprimento médio das ramificações em comparação ao grupo salina. (A) Número de células GFAP-imunopositivas/0,5mm<sup>2</sup>; (B) Número de ramificações/mm<sup>2</sup>. (C) Comprimento médio das ramificações ( $\mu$ m)/mm<sup>2</sup>.  $\phi$  vs respectivo lado contralateral; \* vs respectivo grupo salina. Anova de duas vias seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey, valores apresentados em forma de mediana  $\pm$ erro padrão da média.

## 5. Discussão

---

O objetivo deste estudo foi analisar, em ratos hemiparkinsonianos sob tratamento crônico com L-DOPA: (i) as consequências motoras causadas pela microinjeção intraestriatal da neurotoxina 6-OHDA e a análise da progressão da lesão por meio da expressão da enzima tirosina hidroxilase; (ii) quantidade e morfologia de astrócitos presentes no estriado; (iii) efeito da associação com terapia aguda e crônica com a DOX, sobre quantidade e morfologia de astrócitos presentes na Substância Negra.

Nossos resultados indicam que a microinjeção de 6-OHDA induziu prejuízo motor (redução do uso da pata contralateral a lesão, teste da caminhada) nos animais e perda de terminais dopaminérgicos no estriado e corpos celulares na SN. O tratamento prolongado com L-DOPA induziu os movimentos involuntários anormais em 90% dos ratos em membro dianteiro contralateral a lesão, estruturas orofaciais, bem como no tronco. A administração aguda de DOX reduziu a discinesia já estabelecida pela L-DOPA e a administração de DOX concomitante a L-DOPA preveniu o desenvolvimento da discinesia. Estes resultados estão apresentados no manuscrito Bortolanza, Nascimento et al., (2021) e no ANEXO A.

A análise estatística mostrou aumento significativo do número de células GFAP-*imunopositivas* no lado ipsilateral da região dorsal do estriado em nível rostral e medial e na região ventral em nível medial. Houve ainda aumento significativo no número de ramificações no lado ipsilateral na região dorsal do estriado medial. O tratamento com L-DOPA corroborou com aumento do número de células GFAP-*imunopositivas* na região dorsal do estriado medial (tanto no lado ipsi quanto no lado contralateral a lesão) e no lado ipsilateral da região ventral do estriado medial. O grupo tratado com L-DOPA também expressou aumento do número de ramificações no lado ipsilateral a lesão na região ventral do estriado rostral.

Na SN, o grupo que recebeu L-DOPA expressou um maior comprimento médio das ramificações na região da SNc dorsal em nível rostral, nessa mesma região, porém em nível caudal, o comprimento médio das ramificações também foi significativamente maior, tanto no grupo tratado com salina quanto no grupo tratado com L-DOPA, no lado ipsilateral a lesão quando comparado com o lado contralateral.

A análise no número e morfologia das células que expressam GFAP em SN de animais tratados com DOX, em única administração ou concomitante com L-DOPA, indica distintas alterações de acordo com a região analisada. Na SN compacta dorsal, foi encontrado um aumento no número dessas células no lado ipsilateral a lesão em nível rostral e caudal. Na análise morfológica da SNc dorsal, em nível medial, no lado ipsilateral a lesão, o número de

ramificações do grupo L-DOPA foi significativamente maior do que do grupo tratado cronicamente com DOX e salina. Ainda em nível medial, o comprimento médio das ramificações foi maior, em todos os grupos no lado ipsilateral a lesão quando comparado ao lado contralateral.

Na SN compacta lateral, o lado ipsilateral a lesão expressou, em todos os grupos, um maior número de células GFAP-imunopositivas nos três níveis de secção (rostral, medial e caudal). O tratamento crônico com L-DOPA aumentou número de ramificações das células GFAP-imunopositivas, em nível medial, no lado contralateral a lesão, quando comparado ao grupo DOXag. O número de ramificações destas células em todos os grupos do lado ipsilateral a lesão, da região caudal, foi significativamente maior do que do respectivo lado contralateral a lesão.

Na SN reticulada, em nível rostral, todos os grupos expressaram, no lado ipsilateral, um maior número de células GFAP-imunopositivas e um maior comprimento médio das ramificações. Em nível medial, o número de ramificações e o comprimento médio das ramificações foi significativamente maior em todos os grupos no lado ipsilateral quando comparados ao lado contralateral. Em nível caudal, todos os grupos expressaram, no lado ipsilateral a lesão, um maior número de células GFAP-imunopositivas em comparação ao lado contralateral a lesão. Ainda em nível caudal, no lado ipsilateral a lesão o grupo DOXch expressou um maior número de células GFAP-imunopositivas em comparação ao grupo salina, e o comprimento médio das ramificações é significativamente maior no grupo L-DOPA em comparação ao grupo salina.

#### **-Efeitos da DOX sobre LID:**

A neurodegeneração de neurônios dopaminérgicos ocasiona os sintomas motores da DP (bradiscinesia, acinesia e tremor no repouso), nas últimas décadas vários modelos animais foram desenvolvidos para simular esta patologia humana em laboratório (Blesa et. al, 2012). Os modelos de roedores com lesão induzida pela neurotoxina 6-OHDA é um dos mais utilizados e bem caracterizados para o estudo de déficits motores parkinsonianos e LIDs (Tronci e Vancardo, 2018). A microinjeção intracerebral de 6-OHDA causa morte de neurônios dopaminérgicos, por meio da produção de radicais livres reativos, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e ativação microglial (Mazzio et al. 2004; Perfeito et al. 2013). Essas características evidenciam uma grande vantagem desse modelo, uma vez que degeneração dopaminérgica sustentada e outras características patológicas, como ativação

microglial e estresse radical, recapitulam aspectos importantes da condição humana (Cicchetti et al. 2002; Cohen 1984).

Uma gama de testes comportamentais foi devidamente validada a fim de quantificar o grau de comprometimento comportamental, bem como para detectar efeitos de potenciais tratamentos anti-parkinsonianos (Tronci e Vancardo, 2018). Após a microinjeção intracerebral unilateral de 6-OHDA os roedores apresentam assimetria rotacional, o comportamento rotacional contralateral ocorre em resposta à administração de agonistas de receptores dopaminérgicos (como a apomorfina), devido à hipersensibilidade dos receptores dopaminérgicos estriatais (Ungerstedt 1971). O comportamento rotacional pode ser quantificado, e de acordo com Cenci et al., 1998 e Ludblad et al., 2004, os ratos que apresentam mais de 90 rotações contralaterais, após a administração de apomorfina, possuem depleção de mais de 95% da dopamina estriatal. Dessa forma, selecionamos para o nosso estudo apenas os ratos que atenderam a esse critério.

Ratos e camundongos hemi-parkinsonianos apresentam um comprometimento funcional acentuado no movimento de pisada e no número de passos realizados com o membro contralateral à lesão induzida por 6-OHDA, em comparação com o ipsilateral (Tronci e Vancardo, 2018), que foi o caso dos nossos animais, que apresentaram redução do uso da pata contralateral a lesão no teste da caminhada.

A administração oral de L-DOPA é capaz de restaurar os níveis de DA estriatais e aliviar significativamente os prejuízos motores em pacientes com DP (Olanow et al. 2004). Desde sua introdução em 1967, a L-DOPA continua sendo o medicamento mais eficaz para DP em clínica, sendo capaz de amenizar significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Fahn 2015). No entanto, embora a L-DOPA seja inicialmente bem tolerado, com a progressão da doença a maioria dos pacientes com DP apresentam uma redução do efeito terapêutico da L-DOPA (Rascol et al. 2000).

O modelo de doença de Parkinson induzido por 6-OHDA em ratos vem sendo amplamente utilizado para estudar a LID. De fato, enquanto a administração aguda de doses terapêuticas de L-DOPA é capaz de aliviar o parkinsonismo sintomático, amenizando o desempenho do membro dianteiro prejudicado, em ratos lesionados (Duty e Jenner 2011; Ludblad et al. 2002; Olsson et al. 1995), administrações repetidas do precursor de dopamina induzem AIMs que afetam o lado do corpo contralateral ao estriado lesionado (Delfino et al. 2004; Mela et al. 2012; Taylor et al. 2005). Os AIMs em ratos são classificados em escalas



com base em sua distribuição topográfica, duração e amplitude (Lundblad et al. 2002; Winkler et al. 2002; Padovan-Neto et. al, 2009).

Embora os mecanismos subjacentes a LID não estejam completamente esclarecidos, nas últimas décadas, um grande conjunto de evidências foi fornecido, indicando o envolvimento de múltiplos componentes da rede neuronal dos gânglios da base no desenvolvimento e manifestação da LID. Além disso, a nível molecular, uma série de modificações que afetam a transdução de sinal e a neurotransmissão e ocorrem em populações específicas de neurônios alvo da L-DOPA têm sido causalmente ligadas ao surgimento da LID (Carta et. al, 2016).

Mais recentemente, a neuroinflamação, que já é uma reconhecida característica da DP, também tem sido associada a LID. No estriado de ratos lesionados com 6-OHDA e com LID foi encontrado aumento de micróglia ativada e de citocinas pró-inflamatórias (Barnum et al., 2008; Bortolanza et al., 2015a; Mulas et al., 2016). Os astrócitos respondem a diversas formas de insultos do SNC, como infecção, trauma, isquemia e doenças neurodegenerativas, por um processo comumente referido como astrogliose reativa, que envolve alterações na sua expressão molecular e morfologia (Eddleston e Mucke, 1993; Pekny e Nilsson, 2005; Sofroniew, 2005; Maragakis e Rothstein, 2006; Correa-Cerro e Mandel, 2007).

Para Sofroniew, 2009 a astrogliose reativa é composta por quatro características-chave que são interdependentes: (i) astrogliose reativa se caracteriza por uma gama de mudanças nos astrócitos que ocorrem em resposta a todas as formas e gravidades de lesão e doença do SNC, incluindo perturbações sutis; (ii) as modificações sofridas nos astrócitos reativos variam de acordo com o tipo e a gravidade do insulto, e são alterações graduais na expressão molecular, hipertrofia celular progressiva e, em casos graves, proliferação e formação de cicatrizes, (iii) as alterações da astrogliose são reguladas de maneira específica do contexto por eventos de sinalização específicos que tenham a capacidade de modificar tanto o tipo quanto o grau dessas alterações; (iv) as alterações sofridas durante a astrogliose reativa têm o potencial de alterar as atividades de astrócitos, tanto por meio do ganho quanto da perda de funções que podem impactar tanto de maneira benéfica quanto de maneira prejudicial as células neurais e não neurais circundantes.

No cérebro de pacientes com doenças neurodegenerativas, os astrócitos são conhecidos por migrarem e se tornarem hipertróficos, ou seja, astrócitos reativos (Miyazaki e Asanuma, 2020). Entretanto, ainda não se tem um consenso sobre os astrócitos na DP, análises *post-mortem* de cérebros de pacientes apresentaram um leve aumento no número de

astrócitos e na imunoreatividade para GFAP na SNc (McGeer e McGeer, 2008; Mirza et al., 2000), por outro lado, alguns relatos indicam que o número e a morfologia dos astrócitos não são alterados no cérebro de pacientes (Knott, Wilkin, e Stern, 1999; Tong et al., 2015). Damier et al. (1993) relataram que a densidade de células GFAP positivas nas diferentes áreas dopaminérgicas foi significativamente correlacionada com a intensidade da lesão neuronal no cérebro de DP. Esses resultados sugerem que os neurônios dopaminérgicos dentro de áreas pouco povoadas com astrócitos tendem a se degenerar (Miyazaki e Asanuma, 2020).

Os mecanismos celulares e moleculares que levam à astrogliose não são completamente compreendidos, mas as vias neuroinflamatórias parecem desencadear a astrogliose agravante (Carta et al., 2016). Estudos pré-clínicos sugeriram que a LID pode estar relacionada a um ambiente "pró-inflamatório" no estriado (Barnum et al., 2008; Bortolanza et al., 2015a,b; Del-Bel et al., 2016; Mulas et al., 2016). Estudos indicaram uma considerável regulação da astrogliose no estriado de ratos com lesionados com 6 OHDA e que desenvolveram LID (Bortolanza et al., 2015a; Mulas et al., 2016) apoiando um papel de astrócitos na LID. Os indicativos de astrogliose reativa (aumento da imunoreatividade para GFAP, o alargamento de corpos celulares de astrócitos, a remodelação dos processos) restringiram-se ao hemisfério ipsilateral da lesão com 6-OHDA em ratos que recebem L-DOPA (Bortolanza et al., 2015a). Além disso, o aumento do GFAP se correlacionou com a incidência de LID, ou seja, animais discinéticos vs. não-discinéticos (Mulas et al., 2016).

Um estudo do nosso grupo mostrou que o tratamento de ratos hemiparkinsonianos com L-DOPA induziu uma reação astrocitária intensa ocorrendo no estriado, moderada na substância negra reticulada e compacta ventral e lateral e uma reação mais branda no globo pálido (Cavalcanti-Kwiatkoski, 2012).

A LID é a grande limitação na terapia com L-DOPA, dessa forma a descoberta de novas estratégias terapêuticas é uma necessidade urgente, para a qual tem se despertado interesse crescente no reaproveitamento de drogas já comercializadas.

### **-Efeitos da DOX e da L-DOPA sobre células GFAP-imunopositivas**

Evidências experimentais apontam que as tetraciclinas, além de possuírem propriedades antimicrobianas, podem proteger contra doenças neurodegenerativas (Blum et al. 2004; Forloni et al. 2009; Noble et al. 2009a, b; Ruzza et al. 2014; Stoilova et al. 2013) e neuropsiquiátricas (Keller et al. 2013). Essas drogas exibem uma série de funções de proteção cerebral (Gordon et al. 2012; Moon et al. 2012), incluindo a redução de processos

neuroinflamatórios (Gordon et al. 2012; Noble et al. 2009a, b; Nordstrom et al. 1998; Sultan et al. 2013) e redução de estresse oxidativo (Kim e Suh 2009; Mao et al. 2005; Rothstein et al. 2005; Tomiyama et al. 1996a).

A capacidade da DOX, uma tetraciclina de segunda geração, de atenuar diferentes desordens neurológicas tem sido demonstrada por diversos estudos em modelos animais de diferentes doenças, como Distrofia Muscular Congênita tipo 1A (Girgenrath et al., 2009), Doença de Alzheimer (Costa et al., 2011) e Doença de Huntington (Padino et al., 2020). Estudos do nosso grupo demonstram que a DOX inibe a degeneração de neurônios dopaminérgicos induzida por 6-OHDA (Lazzarini et al., 2013), que doses subantibióticas de DOX são capazes de remodelar *in vitro* a agregação de  $\alpha$ -sinucleína (Gonzalez-Lizarraya et al., 2017) e que a DOX diminui a LID em ratos hemi-parkinsonianos (Bortolanza et al., 2021). Esses últimos resultados também foram demonstrados no presente estudo.

Um amplo espectro de efeitos das tetraciclinas no sistema nervoso pode ser atribuído às suas propriedades não antibióticas (Sapadin e Fleischmajer 2006). Relatos mostram que DOX e MIN diminuem inflamações de várias etiologias (Bahrami et al. 2012). De fato, as tetraciclinas atenuam tanto as respostas imunes inatas quanto as adaptativas (Griffin et al. 2010). Já foi demonstrado que MIN e DOX exercem seus efeitos anti-inflamatórios no cérebro, em parte, por modulação das células gliais.

## **6.Considerações finais**

---

Nossos resultados indicam que:

- A microinjeção de 6-OHDA induziu prejuízo motor nos animais e perda de terminais dopaminérgicos no estriado e corpos celulares na substância negra e o tratamento prolongado com L-DOPA induziu os movimentos involuntários anormais em 90% dos ratos em membro dianteiro contralateral a lesão, estruturas orofaciais, bem como no tronco.
- A administração aguda de doxiciclina reduziu a discinesia já estabelecida pela L-DOPA e a administração de doxiciclina concomitante a L-DOPA preveniu o desenvolvimento da discinesia.
- O tratamento de ratos parkinsonianos com L-DOPA aumentou o número de células imunorreativas ao GFAP no estriado dorsomedial e dorsocaudal, ipsilateral à lesão, com aumento do número de ramificações. Na SN-compacta dorsal lateral, medial e caudal, assim como na SN-reticulada foram observadas modificações no número de células imunorreativas ao GFAP assim como do número e comprimento das ramificações.
- O tratamento crônico com doxiciclina atenuou os sinais de ativação dos astrócitos nas subdivisões da substância negra estudadas.

## **7. Referências bibliográficas**

---

Albin, R. L., Young, A. B., & Penney, J. B. (1989). The functional anatomy of basal ganglia disorders. **Trends in Neurosciences**, 12(10), 366–375. doi:10.1016/0166-2236(89)90074-x

Alle, N.J. e Barres, B.A. (2005) Signaling between glia and neurons: focus on synaptic plasticity. **Curr. Op. Neurobiol.**, 15: 542-548

Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. **Science**. 2018;362(6411):181-185. doi:10.1126/science.aat0473

Anderson, C.M. e Nedergaard, M. (2003) Astrocyte-mediated control of cerebral microcirculation. **Trends Neurosc.**, 26: 340-344.

Anderson, J.M., Hughes, J.D., Gonzalez, Rothi. L.J., Crucian, G.P., Heilman, K.M., 1999. Developmental stuttering and Parkinson's disease: The effects of levodopa treatment. **Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry**. 66(6):776-8. doi: 10.1136/jnnp.66.6.776

Aron Badin R, Spinnewyn B, Gaillard MC, Jan C, Malgorn C, Van Camp N, Dollé F, Guillemier M, Boulet S, Bertrand A, Savasta M, Auguet M, Brouillet E, Chabrier PE, Hantraye P. IRC-082451, a novel multitargeting molecule, reduces L-DOPA-induced dyskinesias in MPTP Parkinsonian primates. **PLoS One**. 2013;8(1):e52680. doi: 10.1371/journal.pone.0052680. Epub 2013 Jan 3. PMID: 23300984; PMCID: PMC3536787.

Bahrami F, Morris DL, Pourgholami MH. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. **Mini Rev Med Chem**. 2012 Jan;12(1):44-52. doi: 10.2174/138955712798868977. PMID: 22070692.

Barnum CJ, Eskow KL, Dupre K, Blandino P Jr, Deak T, Bishop C. Exogenous corticosterone reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: role for interleukin-1beta. **Neuroscience**. 2008 Sep 22;156(1):30-41. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.07.016. Epub 2008 Jul 12. PMID: 18687386; PMCID: PMC2615135.

Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. **Neuron** 2008;60:430–440. [PubMed: 18995817]

Beaulieu JM, Gainetdinov RR. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol Rev**. 2011 Mar;63(1):182-217. doi: 10.1124/pr.110.002642. Epub 2011 Feb 8. PMID: 21303898.

Bezzi, P. e Volterra, A. (2001) A neuron-glia signaling network in the active brain. **Curr. Op. Neurobiol.**, 11: 387-394.

Blackwood, R.K., J.J. Beereboom, H.H. Rennhard, et al . 1961. 6-Methylenetetracyclines. I. A new class of antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 83: 2773–2774.

Blesa J, Phani S, Jackson-Lewis V, Przedborski S (2012) Classic and new animal models of Parkinson's disease. **J Biomed Biotechnol** 2012:845618

Block ML, Hong JS (2005) Microglial and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. **Prog Neurobiol** 76(2):77–98

Blum D, Chtarto A, Tenenbaum L, Brotchi J, Levivier M (2004) Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders, **Neurobiol Dis** 17(3):359–366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.07.012>

Boi L, Pisanu A, Greig NH, Scerba MT, Tweedie D, Mulas G, Fenu S, Carboni E, Spiga S, Carta AR. Immunomodulatory drugs alleviate l-dopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Mov Disord**. 2019 Dec;34(12):1818-1830.

Bolam JP, Ellender TJ. Histamine and the striatum. *Neuropharmacology*. 2016 Jul;106:74-84. doi: 10.1016/j.neuropharm.2015.08.013. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26275849; PMCID: PMC4917894.

Bortolanza M, Cavalcanti-Kiwiatkoski R, Padovan-Neto FE, da-Silva CA, Mitkovski M, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. 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. **Neurobiol Dis**. 2015 Jan;73:377-87. doi: 10.1016/j.nbd.2014.10.017. Epub 2014 Oct 30. PMID: 25447229.

Bortolanza M, do Nascimento GC, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. Doxycycline and its derivative, COL-3, decrease dyskinesia induced by L-DOPA in hemiparkinsonian rats. **Br J Pharmacol**. 2021 Jul;178(13):2595-2616. doi: 10.1111/bph.15439. Epub 2021 Apr 21. PMID: 33751546.

Bortolanza M, Nascimento GC, Socias SB, Ploper D, Chehín RN, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson's disease. **J Neural Transm** (Vienna). 2018 Oct;125(10):1403-1415. doi: 10.1007/s00702-018-1913-1. Epub 2018 Aug 14. PMID: 30109452.

Bortolanza M, Padovan-Neto FE, Cavalcanti-Kwiatkoski R, Dos Santos-Pereira M, Mitkovski M, Raisman-Vozari R, Del-Bel E. Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**. 2015 Jul 5;370(1672):20140190. doi: 10.1098/rstb.2014.0190. PMID: 26009769; PMCID: PMC4455759.

Braak H, Sastre M, Del Tredici K. 2007. Development of alpha-synuclein immunoreactive astrocytes in the forebrain parallels stages of intraneuronal pathology in sporadic Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**. 114: 231-41.

Cabezas R, et al., 2014. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. **Front Cell Neurosci**. 8, 211.

Cabreira V, Massano J. Doença de Parkinson: Revisão Clínica e Atualização [Parkinson's Disease: Clinical Review and Update]. **Acta Med Port**. 2019;32(10):661-670. doi:10.20344/amp.11978

Calabresi P, Centonze D, Gubellini P, Pisani A, Bernardi G. Blockade of M2-like muscarinic receptors enhances long-term potentiation at corticostriatal synapses. **Eur J Neurosci**. 1998 Sep;10(9):3020-3. doi: 10.1111/j.1460-9568.1998.00348.x. PMID: 9758172.

Calabresi P, Picconi B, Tozzi A, Ghiglieri V, Di Filippo M. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nat Neurosci**. 2014 Aug;17(8):1022-30. doi: 10.1038/nn.3743. Epub 2014 Jul 28. PMID: 25065439.

Calon F, Rajput AH, Hornykiewicz O, Bédard PJ, Di Paolo T. Levodopa-induced motor complications are associated with alterations of glutamate receptors in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**. 2003 Dec;14(3):404-16. doi: 10.1016/j.nbd.2003.07.003. PMID: 14678757.

Carli M, Evenden JL, Robbins TW. Depletion of unilateral striatal dopamine impairs initiation of contralateral actions and not sensory attention. **Nature**. 1985 Feb 21-27;313(6004):679-82. doi: 10.1038/313679a0. PMID: 3974701.

Carta AR, Mulas G, Bortolanza M, Duarte T, Pillai E, Fisone G, Vozari RR, Del-Bel E. L-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role? **Eur J Neurosci**. 2017 Jan;45(1):73-91. doi: 10.1111/ejn.13482. Epub 2016 Dec 9. PMID: 27859864.

Cavalcanti-Kwiatkoski, Roberta. 2012

Cenci MA, Ohlin KE, Odin P (2011) Current options and future possibilities for the treatment of dyskinesia and motor fluctuations in Parkinson's disease. **CNS Neurol Disord Drug Targets** 10:670–684

Cenci MA. Presynaptic Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia: The Findings, the Debate, and the Therapeutic Implications. **Front Neurol**. 2014 Dec 15;5:242. doi: 10.3389/fneur.2014.00242. PMID: 25566170; PMCID: PMC4266027.

Cenci, M.A., Lundblad, M., 2007. Ratings of L-DOPA-induced dyskinesia in the unilateral 6-OHDA lesion model of Parkinson's disease in rats and mice. **Curr Protoc**



**Neurosci.** Chapter 9:Unit 9.25. doi: 10.1002/0471142301.ns0925s41.

Chen J, Song J, Yuan P et al (2011) Orientation and cellular distribution of membrane-bound catechol-O-methyltransferase in cortical neurons: implications for drug development. **J Biol Chem** 286:34752–34760

Chen X, Cho DB, Yang PC. Double staining immunohistochemistry. **N Am J Med Sci.** 2010 May;2(5):241-5. doi: 10.4297/najms.2010.2241. PMID: 22574297; PMCID: PMC3347652.

Chen, X., Wang, Y., Wu, H. et al. Research advances on L-DOPA-induced dyskinesia: from animal models to human disease. **Neurol Sci** 41, 2055–2065 (2020). <https://doi.org/10.1007/s10072-020-04333-5>

Cho DC, Cheong JH, Yang MS, Hwang SJ, Kim JM, Kim CH (2011) The effect of minocycline on motor neuron recovery and neuropathic pain in a rat model of spinal cord injury. **J Korean Neurosurg Soc** 49(2):83–91. <https://doi.org/10.3340/jkns.2011.49.2.83>

Christenson JG, Dairman W, Udenfriend S (1970) Preparation and properties of a homogeneous aromatic L-amino acid decarboxylase from hog kidney. **Arch Biochem Biophys** 141:356–367

Cicchetti F, Brownell AL, Williams K et al (2002) Neuroinflammation of the nigrostriatal pathway during progressive 6-OHDA dopamine degeneration in rats monitored by immunohistochemistry and PET imaging. **Eur J Neurosci** 15:991–998

Cohen G (1984) Oxy-radical toxicity in catecholamine neurons. **Neurotoxicology** 5:77–82

Correa-Cerro LS, Mandell JW. Molecular mechanisms of astrogliosis: new approaches with mouse genetics. **J Neuropathol Exp Neurol** 2007;66:169–176. [PubMed: 17356378]

Miyazaki I, Asanuma M. Neuron-Astrocyte Interactions in Parkinson's Disease. **Cells.** 2020 Dec 7;9(12):2623. doi: 10.3390/cells9122623. PMID: 33297340; PMCID: PMC7762285.

Croisier E, Graeber MB. Glial degeneration and reactive gliosis in alpha-synucleinopathies: the emerging concept of primary gliodegeneration. **Acta Neuropathol.** 2006;112:517–530. doi: 10.1007/s00401-006-0119-z.

Cunningham C, Wilcockson DC, Champion S, Lunnon K, Perry VH. Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. **J Neurosci.** 2005 Oct 5;25(40):9275-84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2614-05.2005. PMID: 16207887; PMCID: PMC6725757.

Damier P, Hirsch EC, Zhang P, Agid Y, Javoy-Agid F, 1993. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience** 52: 1–6.

Damier P., Hirsch E.C., Zhang P., Agid Y., Javoy-Agid F. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. **Neuroscience.** 1993;52:1–6. doi: 10.1016/0306-4522(93)90175-F.

Dauer W, Przedborski S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron.** 2003 Sep 11;39(6):889-909. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00568-3. PMID: 12971891. Toulouse A, Sullivan AM. Progress in Parkinson's disease-where do we stand? **Prog Neurobiol.** 2008 Aug;85(4):376-92. doi: 10.1016/j.pneurobio.2008.05.003. Epub 2008 Jun 5. PMID: 18582530.

De Virgilio, A., Greco, A., Fabbrini, G., Inghilleri, M., Rizzo, M. I., Gallo, A., Conte M., Rosato C., Ciniglio M. A., de Vincentiis, M. (2016). Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation. **Autoimmunity Reviews**, 15(10), 1005–1011. doi:10.1016/j.autrev.2016.07.022

Del Rosso, J. Q. Oral doxycycline in the management of acne vulgaris: current perspectives on clinical use and recent findings with a new double-scored small tablet formulation. **J Clin Aesthet Dermatol**, v. 8, n. 5, p. 19-26, 2015.

Del-Bel E, Bortolanza M, Dos-Santos-Pereira M, Bariotto K, Raisman-Vozari R. L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key

elements? **Synapse**. 2016 Dec;70(12):479-500. doi: 10.1002/syn.21941. Epub 2016 Sep 27. PMID: 27618286.

Delfino M, Stefano A, Ferrario J et al (2004) Behavioral sensitization to different dopamine agonists in a parkinsonian rodent model of drug-induced dyskinesias. **Behav Brain Res** 152:297–306

DeLong MR. Primate models of movement disorders of basal ganglia origin. **Trends Neurosci**. 1990 Jul;13(7):281-5. doi: 10.1016/0166-2236(90)90110-v. PMID: 1695404.

Dexter DT, Jenner P 2013 Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms *Free Radic Biol Med*, 62: 132–144.

Dickson DW. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. **Cold Spring Harb Perspect Med** 2012;2.

DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. **J Neurochem**. 2016 Oct;139 Suppl 2(Suppl 2):136-153. doi: 10.1111/jnc.13607. Epub 2016 May 4. PMID: 26990767; PMCID: PMC5025335.

Domercq M, Matute C (2004) Neuroprotection by tetracyclines. **Trends Pharmacol Sci** 25(12):609–612. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.10.001>

Dominguez-Meijide A, Parrales V, Vasili E, González-Lizárraga F, König A, Lázaro DF, Lannuzel A, Haik S, Del Bel E, Chehín R, Raisman-Vozari R, Michel PP, Bizat N, Outeiro TF. Doxycycline inhibits  $\alpha$ -synuclein-associated pathologies in vitro and in vivo. **Neurobiol Dis**. 2021 Apr;151:105256. doi: 10.1016/j.nbd.2021.105256. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33429042.

DUGGAR BM. Aureomycin; a product of the continuing search for new antibiotics. **Ann N Y Acad Sci**. 1948 Nov 30;51(Art. 2):177-81. doi: 10.1111/j.1749-6632.1948.tb27262.x. PMID: 18112227.

Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br J Pharmacol** 164:1357–1391

Eddleston M, Mucke L. Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. **Neuroscience**. 1993 May;54(1):15-36. doi: 10.1016/0306-4522(93)90380-x. PMID: 8515840; PMCID: PMC7130906.

Eiden LE, Weihe E (2011) VMAT2: a dynamic regulator of brain monoaminergic neuronal function interacting with drugs of abuse. **Ann N Y Acad Sci** 1216:86–98.

Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS (2004) Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. **Pharmacol Rev** 56:331

Espay AJ, Morgante F, Merola A, et al. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: Current and evolving concepts. **Ann Neurol**. 2018;84(6):797-811. doi:10.1002/ana.25364

Fahn S (2015) The medical treatment of Parkinson disease from James Parkinson to George Cotzias. **Mov Disord** 30:4–18

Fahn S, Oakes D, Shoulson I, Kieburtz K, Rudolph A, Lang A, Olanow CW, Tanner C, Marek K; Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **N Engl J Med**. 2004 Dec 9;351(24):2498-508. doi: 10.1056/NEJMoa033447. PMID: 15590952.

Fahn S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. **Ann Neurol**. 2000 Apr;47(4 Suppl 1):S2-9; discussion S9-11. PMID: 10762127.

Färber K, Kettenmann H. Physiology of microglial cells. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005 Apr;48(2):133-43. doi: 10.1016/j.brainresrev.2004.12.003. PMID: 15850652.

Fernstrom JD, Fernstrom MH (2007) Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. **J Nutr** 137:1539S–1547S

Forloni G, Salmona M, Marcon G, Tagliavini F (2009) Tetracyclines and prion infectivity. **Infect Disord Drug Targets** 9(1):23–30. <https://doi.org/10.2174/1871526510909010023>

Gao HM, Liu B, Zhang W, Hong JS. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci.** 2003 Aug;24(8):395-401. doi: 10.1016/S0165-6147(03)00176-7. PMID: 12915048.

Gee, J.R. e Keller, J.N. (2005) Astrocytes: regulation of brain homeostasis via apolipoprotein **Eur. Int. J. Biochem. Cell Biol.**, 37: 1145-1150.

Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma FJ Jr, Sibley DR. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. **Science.** 1990 Dec 7;250(4986):1429-32. doi: 10.1126/science.2147780. PMID: 2147780.

Girgenrath M, Beermann ML, Vishnudas VK, Homma S, Miller JB. Pathology is alleviated by doxycycline in a laminin-alpha2-null model of congenital muscular dystrophy. **Ann Neurol.** 2009 Jan;65(1):47-56. doi: 10.1002/ana.21523. PMID: 19086074; PMCID: PMC2639627.

Glass CK, Saijo K, Winner B, Marchetto MC, Gage FH (2010) Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell** 140(6):918–934

Golub LM, Soummalainen K, Sorsa T (1992) Host modulation with tetracyclines and their chemically modified analogues. **Curr Opin Dent** 2:80–90. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.149934>

González-Lizárraga F, Socías SB, Ávila CL, Torres-Bugeau CM, Barbosa LR, Binolfi A, Sepúlveda-Díaz JE, Del-Bel E, Fernandez CO, Papy-Garcia D, Itri R, Raisman-Vozari R, Chehín RN. Repurposing doxycycline for synucleinopathies: remodelling of  $\alpha$ -synuclein oligomers towards non-toxic parallel beta-sheet structured species. **Sci Rep.** 2017 Feb 3;7:41755. doi: 10.1038/srep41755. PMID: 28155912; PMCID: PMC5290535.

Gordon RA, Mays R, Sambrano B, Mayo T, Lapolla W (2012) Antibiotics used in nonbacterial dermatologic conditions. **Dermatol Ther** 25(1):38–54. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8019.2012.01496.x>

Gray MT, Woulfe JM, 2015. Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson's disease. **J Cereb Blood Flow Metab.** 35, 747–50.

Graybiel AM. The basal ganglia and cognitive pattern generators. **Schizophr Bull.** 1997;23(3):459-69. doi: 10.1093/schbul/23.3.459. PMID: 9327509.

Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleiotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. **Am J Physiol Cell Physiol.** 2010 Sep;299(3):C539-48. doi: 10.1152/ajpcell.00047.2010. Epub 2010 Jun 30. PMID: 20592239; PMCID: PMC2944325.

Guillot TS, Miller GW (2009) Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. **Mol Neurobiol** 39:149–170.

Haber SN. The primate basal ganglia: parallel and integrative networks. **J Chem Neuroanat.** 2003 Dec;26(4):317-30. doi: 10.1016/j.jchemneu.2003.10.003. PMID: 14729134.

Hauber W. Involvement of basal ganglia transmitter systems in movement initiation. **Prog Neurobiol.** 1998 Dec;56(5):507-40. doi: 10.1016/s0301-0082(98)00041-0. PMID: 9775402.

Hikosaka O, Nakamura K, Sakai K, Nakahara H. Central mechanisms of motor skill learning. **Curr Opin Neurobiol.** 2002 Apr;12(2):217-22. doi: 10.1016/s0959-4388(02)00307-0. PMID: 12015240.

Hira VV, Ploegmakers KJ, Grevers F, Verbovšek U, Silvestre-Roig C, Aronica E, Tigchelaar W, Turnšek TL, Molenaar RJ, Van Noorden CJ. CD133+ and Nestin+ Glioma Stem-Like Cells Reside Around CD31+ Arterioles in Niches that Express SDF-1 $\alpha$ , CXCR4, Osteopontin and Cathepsin K. **J Histochem Cytochem.** 2015 Jul;63(7):481-93. doi: 10.1369/0022155415581689. Epub 2015 Mar 25. PMID: 25809793.

Hira VVV, Wormer JR, Kakar H, Breznik B, van der Swaan B, Hulsbos R, Tigchelaar W, Tonar Z, Khurshed M, Molenaar RJ, Van Noorden CJF. Periarteriolar Glioblastoma Stem Cell Niches Express Bone Marrow Hematopoietic Stem Cell Niche Proteins. **J Histochem Cytochem.** 2018 Mar;66(3):155-173. doi: 10.1369/0022155417749174. Epub 2018 Jan 3. PMID: 29297738; PMCID: PMC5833177.

Hof, P. R., Trapp B.D., deVellis, J., Luz, C e Colman, D.R. (1999) The cellular components of nervous tissue **In: Fundamental Neuroscience**, editado pelos autores, Academic Press, San Diego p. 41-70.

Holloway RG, Shoulson I, Fahn S et al (2004) Pramipexole vs levodopa as initial treatment for Parkinson disease. **Arch Neurol** 61:1044–1053

Jenner P. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Rev Neurosci.** 2008 Sep;9(9):665-77. doi: 10.1038/nrn2471. PMID: 18714325.

Jessen, K.R. (2004) Glial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 36: 1861-1867.

Junior NCF, Dos-Santos-Pereira M, Guimarães FS, Del Bel E. Cannabidiol and Cannabinoid Compounds as Potential Strategies for Treating Parkinson's Disease and L-DOPA-Induced Dyskinesia. **Neurotox Res.** 2020 Jan;37(1):12-29. doi: 10.1007/s12640-019-00109-8. Epub 2019 Oct 22. PMID: 31637586.

Keifman E, Ruiz-DeDiego I, Pafundo DE, Paz RM, Solís O, Murer MG, Moratalla R (2019) Optostimulation of striatonigral terminals in substantia nigra induces dyskinesia that increases after L-DOPA in a mouse model of Parkinson's disease. **Br J Pharmacol** 176(13):2146–2161

Keller WR, Kum LM, Wehring HJ, Koola MM, Buchanan RW, Kelly DL (2013) A review of anti-inflammatory agents for symptoms of schizophrenia. **J Psychopharmacol** 27(4):337–342. <https://doi.org/10.1177/0269881112467089>

Kim HS, Suh YH. Minocycline and neurodegenerative diseases. **Behav Brain Res.** 2009 Jan 23;196(2):168-79. doi: 10.1016/j.bbr.2008.09.040. Epub 2008 Oct 11. PMID: 18977395.

Kitai ST, Deniau JM. Cortical inputs to the subthalamus: intracellular analysis. **Brain Res.** 1981 Jun 15;214(2):411-5. doi: 10.1016/0006-8993(81)91204-x. PMID: 7237177.

Knott C., Wilkin G.P., Stern G. Astrocytes and microglia in the substantia nigra and caudate-putamen in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.** 1999;5:115–122. doi: 10.1016/S1353-8020(99)00022-X.

Kumar A, Accorsi A, Rhee Y, Girgenrath M. Do's and don'ts in the preparation of muscle cryosections for histological analysis. *J Vis Exp.* 2015 May 15;(99):e52793. doi: 10.3791/52793. PMID: 26066009; PMCID: PMC4542757.

Lau LT, Yu AC, 2001. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. **J Neurotrauma.** 18, 351–9.

Lazzarini M, Martin S, Mitkovski M, Vozari RR, Stühmer W, Bel ED (2013) Doxycycline restrains glia and confers neuroprotection in a 6-OHDA Parkinson model. **Glia** 61(7):1084–1100. <https://doi.org/10.1002/glia.22496>

Leal MC, Casabona JC, Puntel M, Pitossi FJ. Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease? **Front Cell Neurosci.** 2013 Apr 29;7:53. doi: 10.3389/fncel.2013.00053. PMID: 23641196; PMCID: PMC3638129.

Liddel S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Munch A.E., Chung W.S., Peterson T.C., et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. **Nature.** 2017;541:481–487. doi: 10.1038/nature21029.

Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science.** 1993 May 21;260(5111):1130-2. doi: 10.1126/science.8493557. PMID: 8493557.

Lotankar S, Prabhavalkar KS, Bhatt LK. Biomarkers for Parkinson's Disease: **Recent Advancement. Neurosci Bull.** 2017;33(5):585-597. doi:10.1007/s12264-017-0183-5

Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci.** 2002 Jan;15(1):120-32. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01843.x. PMID: 11860512. Erratum in: *CNS Drugs.* 2005;19(7):633. PMID: 15330687.

Lundblad M, Andersson M, Winkler C, Kirik D, Wierup N, Cenci MA. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci.** 2002 Jan;15(1):120-32. doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01843.x. PMID: 11860512. Erratum in: *CNS Drugs.* 2005;19(7):633. PMID: 15330687.

Magaki S, Hojat SA, Wei B, So A, Yong WH. An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. **Methods Mol Biol.** 2019;1897:289-298. doi: 10.1007/978-1-4939-8935-5\_25. PMID: 30539453; PMCID: PMC6749998.

Malorny U, Bildau H, Sorg C. Efficient inhibition of endogenous peroxidase without antigen denaturation in immunohistochemistry. **J Immunol Methods.** 1988 Jun 28;111(1):101-7. doi: 10.1016/0022-1759(88)90065-8. PMID: 3292649.

Maragakis NJ, Rothstein JD. Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. **Nat Clin Pract Neurol** 2006;2:679–689. [PubMed: 17117171]

Masato A, Plotegher N, Boassa D, Bubacco L. Impaired dopamine metabolism in Parkinson's disease pathogenesis. **Mol Neurodegener.** 2019;14(1):35. Published 2019 Aug 20. doi:10.1186/s13024-019-0332-6

Matarazzo M, Perez-Soriano A, Stoessl AJ. Dyskinesias and levodopa therapy: why wait? **J Neural Transm (Vienna).** 2018 Aug;125(8):1119-1130. doi: 10.1007/s00702-018-1856-6. Epub 2018 Feb 10. PMID: 29428995.

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

McGeer P.L., McGeer E.G. Glial reactions in Parkinson's disease. **Mov. Disord.** 2008;23:474–483. doi: 10.1002/mds.21751.

Meissner W, Ravenscroft P, Reese R, Harnack D, Morgenstern R, Kupsch A, Klitgaard H, Bioulac B, Gross CE, Bezard E, Borraud T. 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. **Neurobiol Dis.** 2006 Jun;22(3):586-98. doi: 10.1016/j.nbd.2006.01.009. Epub 2006 Mar 10. PMID: 16531050.

Mela F, Marti M, Bido S et al (2012) In vivo evidence for a differential contribution of striatal and nigral D1 and D2 receptors to L-DOPA induced dyskinesia and the accompanying surge of nigral amino acid levels. **Neurobiol Dis** 45:573–582

Mighell AJ, Hume WJ, Robinson PA: An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. **Oral Dis** 4:217–223, 1998

Miki Y, Tanji K, Mori F, Kakita A, Takahashi H, Wakabayashi K. PLA2G6 accumulates in Lewy bodies in PARK14 and idiopathic Parkinson's disease. **Neurosci Lett.** 2017;645:40–45.

Miot HA. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras** 2011, Vol. 10, Nº 4

Mirza B., Hadberg H., Thomsen P., Moos T. The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. **Neuroscience.** 2000;95:425–432. doi: 10.1016/S0306-4522(99)00455-8.

Miyazaki I., Asanuma M., Kikkawa Y., Takeshima M., Murakami S., Miyoshi K., Sogawa N., Kita T. Astrocyte-derived metallothionein protects dopaminergic neurons from dopamine quinone toxicity. **Glia**. 2011;59:435–451. doi: 10.1002/glia.21112.

Morimoto S, Takao M, Hatsuta H et al (2017) Homovanillic acid and 5-hydroxyindole acetic acid as biomarkers for dementia with Lewy bodies and coincident Alzheimer's disease: An autopsy-confirmed study. **PLoS ONE** 12:e0171524

Mulas G, Espa E, Fenu S, Spiga S, Cossu G, Pillai E, Carboni E, Simbula G, Jadžić D, Angius F, Spolitu S, Batetta B, Lecca D, Giuffrida A, Carta AR. Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous l-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**. 2016 Dec;286:83-92. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.09.013. Epub 2016 Sep 30. PMID: 27697481.

Munoz A, Garrido-Gil P, Dominguez-Mejide A, LabandeiraGarcia JL. Angiotensin type 1 receptor blockage reduces l-dopa induced dyskinesia in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. Involvement of vascular endothelial growth factor and interleukin-1beta. **Exp Neurol** 2014;261:720–732.

Nambu A, Tokuno H, Takada M. Functional significance of the cortico-subthalamo-pallidal 'hyperdirect' pathway. **Neurosci Res**. 2002 Jun;43(2):111-7. doi: 10.1016/s0168-0102(02)00027-5. PMID: 12067746.

Nedergaard M, et al. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trends Neurosci** 2003;26:523–530. [PubMed: 14522144]

Nedergaard. M., Ransom, B. e Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trens Neurosc.**, 26: 523-530.

Nedergaard. M., Ransom, B. e Goldman, S.A. (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. **Trens Neurosc.**, 26: 523-530.

Nelson ML (1998) Chemical and biological dynamics of tetracyclines. **Adv Dent Res** 12:5–11. <https://doi.org/10.1177/08959374980120011901>

Newman, E.A. (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. **Trends Neurosc.**, 26: 536-542.

Noble W, Garwood C, Stephenson J, Kinsey AM, Hanger DP, Anderton BH (2009a) Minocycline reduces the development of abnormal tau species in models of Alzheimer's disease. **FASEB J** 23(3):739–750. <https://doi.org/10.1096/fj.08-113795>

Noble W, Garwood CJ, Hanger DP (2009b) Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterized by protein misfolding. **Prion** 3:78–83. <https://doi.org/10.4161/pri.3.2.8820>

Nordström D, Lindy O, Lauhio A, Sorsa T, Santavirta S, Konttinen YT (1998) Anti-collagenolytic mechanism of action of doxycycline treatment in rheumatoid arthritis. **Rheumatol Int** 17(5):175–180

Noyce A.J., Bestwick J.P., Silveira-Moriyama L., Hawkes C.H., Giovannoni G., Lees A.J., et al. Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease **Ann Neurol**, 72 (2012), pp. 893-901

Obeso JA, Rodríguez-Oroz MC, Benitez-Temino B, Blesa FJ, Guridi J, Marin C, Rodriguez M. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. **Mov Disord**. 2008;23 Suppl 3:S548-59. doi: 10.1002/mds.22062. PMID: 18781672.

Olanow CW, Agid Y, Mizuno Y et al (2004) Levodopa in the treatment of Parkinson's disease: current controversies. **Mov Disord** 19:997–1005

Olsson M, Nikkiah G, Bentlage C, Björklund A (1995) Forelimb akinesia in the rat Parkinson model: differential effects of dopamine agonists and nigral transplants as assessed by a new stepping test. **J Neurosci** 15:3863–3875

PA, Eisner GM, Felder RA (2002) Role of dopamine receptors in the kidney in the regulation of blood pressure. **Curr Opin Nephrol Hypertens** 11:87–92.

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(3):927-35. doi: 1465 10.1016/j.neuroscience.2009.01.034.

Paldino E, Balducci C, La Vitola P, Artioli L, D'Angelo V, Giampà C, Artuso V, Forloni G, Fusco FR. Neuroprotective Effects of Doxycycline in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. **Mol Neurobiol**. 2020 Apr;57(4):1889-1903. doi: 10.1007/s12035-019-01847-8. Epub 2019 Dec 26. PMID: 31879858; PMCID: PMC7118056.

Parent A, Hazrati LN. Functional anatomy of the basal ganglia. II. The place of subthalamic nucleus and external pallidum in basal ganglia circuitry. **Brain Res Brain Res Rev**. 1995 Jan;20(1):128-54. doi: 10.1016/0165-0173(94)00008-d. PMID: 7711765.

Paxinos, G. and Watson, C. (1997). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th ed., **Academic Press**, Sandiego.

Pekny M, Nilsson M. Astrocyte activation and reactive gliosis. **Glia** 2005;50:427–434. [PubMed: 15846805]

Pellerin L, et al. Activity-dependent regulation of energy metabolism by astrocytes: an update. **Glia** 2007;55:1251–1262. [PubMed: 17659524]

Pellerin, L. e Magistretti, P.J. (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. **The Neuroscientist**, 10: 53-62.

Pellerin, L. e Magistretti, P.J. (2004) Neuroenergetics: calling upon astrocytes to satisfy hungry neurons. **The Neuroscientist**, 10: 53-62.

Perea, G. e Araque, A. (2005) Glial calcium signaling and neuron-glia communication. **Cell Calcium**, 38: 375-382.

Perez-Lloret S, Otero-Losada M, Toblli JE, Capani F. Renin-angiotensin system as a potential target for new therapeutic approaches in Parkinson's disease. **Expert Opin Investig Drugs**. 2017 Oct;26(10):1163-1173. doi: 10.1080/13543784.2017.1371133. Epub 2017 Aug 29. PMID: 28836869.

Perfeito R, Cunha-Oliveira T, Rego AC (2013) Reprint of: revisiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Parkinson disease—resemblance to the effect of amphetamine drugs of abuse. **Free Radic Biol Med** 62:186–201

Pfeiffer RF. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**. 2016 Jan;22 Suppl 1:S119-22. doi: 10.1016/j.parkreldis.2015.09.004. Epub 2015 Sep 3. PMID: 26372623.

Phatnani H, Maniatis T, 2015. Astrocytes in neurodegenerative disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**. 7.

Phillips JG, Bradshaw JL, Ianssek R, Chiu E. Motor functions of the basal ganglia. **Psychol Res**. 1993;55(2):175-81. doi: 10.1007/BF00419650. PMID: 8356199.

Pinoli M, Marino F, Cosentino M. Dopaminergic Regulation of Innate Immunity: a Review. **J Neuroimmune Pharmacol**. 2017 Dec;12(4):602-623. doi: 10.1007/s11481-017-9749-2. Epub 2017 Jun 3. PMID: 28578466.

Poewe, W., Seppi, K., Tanner, C. et al. Doença de Parkinson. **Nat Rev Dis Primers** 3, 17013 (2017).

Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. **Veterinary Pathology**. 2005;42(4):405-426. doi:10.1354/vp.42-4-405

Rangel-Barajas C, Silva I, Lopéz-Santiago LM, Aceves J, Erlj D, Florán B (2011) L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats is associated with up-regulation of adenylyl cyclase type V/VI and increased GABA release in the substantia nigra reticulata. **Neurobiol Dis** 41(1):51–61

Ransohoff RM, Cardona AE. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. **Nature**. 2010 Nov 11;468(7321):253-62. doi: 10.1038/nature09615. PMID: 21068834.

Rascol O, Brooks DJ, Korczyn AD et al (2000) A five-year study of the incidence of dyskinesia in patients with early Parkinson's disease who were treated with ropinirole or levodopa. **N Engl J Med** 342:1484–1491

Rascol O, Perez-Lloret S, Ferreira JJ (2015) New treatments for levodopa-induced motor complications: new treatments for motor complication. **Mov Disord** 30(11):1451–1460

Reitz C, Mayeux R (2014) Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. **Biochem Pharmacol** 88:640–651.

Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggell C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Hoberg MD, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Buijij LI, Gupta P, Fisher PB.  $\beta$ -lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. **Nature**. 2005;433:73–77. doi: 10.1038/nature03180.

Ruzza C, Rizzi A, Malfacini D, Cerlesi MC, Ferrari F, Marzola E, Ambrosio C, Gro C et al (2014) Pharmacological characterization of tachykinin tetrabranch derivatives. **Br J Pharmacol** 171(17):4125–4137. <https://doi.org/10.1111/bph.12727>

Sande MA, Mandell GL (1985) Antimicrobial agents, tetracyclines. chloramphenicol, erythromycin, and miscellaneous antibacterial agents. In: Goodman and Gilman's (ed) **The pharmacological basis of therapeutics**, 7th edn. McGraw-Hill, New York

Santa-Cecilia FV, Socias B, Ouidja MO, Sepulveda-Diaz JE, Acuña L, Silva RL, Michel PP, Del-Bel E, Cunha TM, Raisman-Vozari R. Doxycycline Suppresses Microglial Activation by Inhibiting the p38 MAPK and NF- $\kappa$ B Signaling Pathways. **Neurotox Res**. 2016 May;29(4):447-59. doi: 10.1007/s12640-015-9592-2. Epub 2016 Jan 8. PMID: 26745968.

Sapadin AN, Fleischmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. **J Am Acad Dermatol**. 2006 Feb;54(2):258-65. doi: 10.1016/j.jaad.2005.10.004. PMID: 16443056.

Savasta M, Dubois A, Scatton B. Autoradiographic localization of D1 dopamine receptors in the rat brain with [3H]SCH 23390. **Brain Res**. 1986 Jun 11;375(2):291-301. doi: 10.1016/0006-8993(86)90749-3. PMID: 2942221.

Savica, R., Grossardt, B. R., Bower, J. H., Ahlskog, J. E. & Rocca, W. A. Incidence and pathology of synucleinopathies and tauopathies related to parkinsonism. **JAMA Neurol**. 70, 859–866 (2013).

Schaar D.G. Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. **Exp. Neurol**. 1993;124:368–371.

Sebastianutto I, Cenci MA (2018) mGlu receptors in the treatment of Parkinson's disease and L-DOPA-induced dyskinesia. **Curr Opin Pharmacol** 38:81–89

Seifert G, et al. Astrocyte dysfunction in neurological disorders: a molecular perspective. **Nat Rev Neurosci** 2006;7:194–206. [PubMed: 16495941]

Shi S-R, Cote RJ, Taylor CR. Antigen Retrieval Techniques Current Perspectives. **J. Histochem. Cytochem**. 2001;49(8):931-937.

Shimizu T, Tanaka T, Uno S, Ashiba H, Fujimaki M, Tanaka M, Awazu K, Makishima M. Detection of antibodies against hepatitis B virus surface antigen and hepatitis C virus core antigen in plasma with a waveguide-mode sensor. **J Biosci Bioeng**. 2017 Jun;123(6):760-764. doi: 10.1016/j.jbiosc.2017.01.004. Epub 2017 Feb 9. PMID: 28190739.

Simard, M. e Nedergaard, M. (2004) The Neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. **Neurosc.**, 129: 877-896.

Skidmore R, Kovach R, Walker C, Thomas J, Bradshaw M, Leyden J, Powala C, Ashley R (2003) Efeitos da doxiciclina de dose subantimicrobiana no tratamento de acne moderada. **Arco Dermatol** 139(4):459-464.



- Smith, K., Leyden, J. J. Safety of doxycycline and minocycline: a systematic review. **Clin Ther**, v27, n. 9, p. 1329-42, 2005.
- Sofroniew MV, 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. **Trends Neurosci.** 32, 638–47.
- Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. **Neuroscientist** 2005;5:400–407. [PubMed: 16151042]
- Solís O, Moratalla R (2018) Dopamine receptors: homomeric and heteromeric complexes in L-DOPA-induced dyskinesia. **J Neural Transm** 125(8):1187–1194
- Somjen GG, Nervenikitt: notes on the history of the concept of neuroglia. **Glia.** 1, 2–9 (1988).
- Stefani A, Pierantozzi M, Olivola E et al (2017) Homovanillic acid in CSF of mild stage Parkinson's disease patients correlates with motor impairment. **Neurochem Int** 105:58–63
- Stephens, C.R., J.J. Beereboom, H.H. Rennhard, et al . 1963. 6-Deoxytetracyclines. IV. Preparation, C-6 stereochemistry, and reactions. **J. Am. Chem. Soc.** 85: 2643–2652.
- Stoilova T, Colombo L, Forloni G, Tagliavini F, Salmona M (2013) A new face for old antibiotics: tetracyclines in treatment of amyloidoses. **J Med Chem** 56(15):5987–6006. <https://doi.org/10.1021/jm400161p>
- Sultan S, Gebara E, Toni N (2013) Doxycycline increases neurogenesis and reduces microglia in the adult hippocampus. **Front Neurosci** 7:131. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00131>
- Sultan S, Gebara E, Toni N. Doxycycline increases neurogenesis and reduces microglia in the adult hippocampus. **Front Neurosci.** 2013 Jul 25;7:131. doi: 10.3389/fnins.2013.00131. PMID: 23898238; PMCID: PMC3722480.
- Swamy DN, Sanivarapu S, Moogla S, Kapalavai V (2015) Chemically modified tetracyclines: the novel host modulating agents. **J Indian Soc Periodontol** 19(4):370–374. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.149934>
- Tansey MG, Goldberg MS. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiol Dis.** 2010;37(3):510–518. doi:10.1016/j.nbd.2009.11.004
- Taylor JL, Bishop C, Walker PD (2005) Dopamine D1 and D2 receptor contributions to L-DOPA-induced dyskinesia in the dopamine-depleted rat. **Pharmacol Biochem Behav** 81:887–893
- Teema AM, Zaitone SA, Moustafa YM. Ibuprofen or piroxicam protects nigral neurons and delays the development of l-dopa induced dyskinesia in rats with experimental Parkinsonism: Influence on angiogenesis. **Neuropharmacology** 2016;107:432–450.
- Teismann P, Schulz JB. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. **Cell Tissue Res.** 2004;318(1):149-161. doi:10.1007/s00441-004-0944-0
- Tong J., Ang L.C., Williams B., Furukawa Y., Fitzmaurice P., Guttman M., Boileau I., Hornykiewicz O., Kish S.J. Low levels of astroglial markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein accumulation. **Neurobiol. Dis.** 2015;82:243–253. doi: 10.1016/j.nbd.2015.06.010.
- Tran TN, Vo TNN, Frei K, Truong DD (2018) Levodopa-induced dyskinesia: clinical features, incidence, and risk factors. **J Neural Transm** 125(8):1109–1117
- Tronci, E., Francardo, V. Animal models of L-DOPA-induced dyskinesia: the 6-OHDA-lesioned rat and mouse. **J Neural Transm** 125, 1137–1144 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1825-5>

Turcano P, Mielke MM, Bower JH, et al. Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease: A population-based cohort study. **Neurology**. 2018;91(24):e2238-e2243. doi:10.1212/WNL.0000000000006643

Twelves D, Perkins KS, Counsell C. Systematic review of incidence studies of Parkinson's disease. **Mov Disord**. 2003 Jan;18(1):19-31. doi: 10.1002/mds.10305. PMID: 12518297.

Udenfriend S, Wyngaarden JB (1956) Precursors of adrenal epinephrine and norepinephrine in vivo. **Biochim Biophys Acta** 20:48–52

Ungerstedt U (1971) Postsynaptic supersensitivity after 6-hydroxy-dopamine induced degeneration of the nigro-striatal dopamine system. **Acta Physiol Scand Suppl** 367:69–93

Vallone D, Picetti R, Borrelli E. Structure and function of dopamine receptors. **Neurosci Biobehav Rev**. 2000 Jan;24(1):125-32. doi: 10.1016/s0149-7634(99)00063-9. PMID: 10654668.

Van Den Eeden, S. K. et al. Incidence of Parkinson's disease: variation by age, gender, and race/ethnicity. **Am. J. Epidemiol**. 157, 1015–1022 (2003).

Vilches-Moure JG, Ramos-Vara JA. Comparison of rabbit monoclonal and mouse monoclonal antibodies in immunohistochemistry in canine tissues. **J. Vet. Diagn. Invest**. 2005;17(4):346.

von Bartheld CS, Bahney J, Herculano S Houzel, The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. **J. Comp. Neurol** 524, 3865–3895 (2016).

Wamsley JK, Gehlert DR, Filloux FM, Dawson TM. Comparison of the distribution of D-1 and D-2 dopamine receptors in the rat brain. **J Chem Neuroanat**. 1989 May-Jun;2(3):119-37. PMID: 2528968.

Warren Olanow C, Kieburtz K, Rascol O, Poewe W, Schapira AH, Emre M, Nissinen H, Leinonen M, Stocchi F (2013) Factors predictive of the development of levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. **Mov Disord** 28:1064–1071

Weinshilboum RM, Thoa NB, Johnson DG et al (1971) Proportional release of norepinephrine and dopamine- $\beta$ -hydroxylase from sympathetic nerves. **Science** 174:1349–1351

Winkler C, Kirik D, Björklund A, Cenci MA (2002) L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. **Neurobiol Dis** 10:165–186

Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in Physiology and Disease. **Annu Rev Physiol**. 2017;79:619-643. doi:10.1146/annurev-physiol-022516-034406

Yang QQ, Zhou JW. Neuroinflammation in the central nervous system: Symphony of glial cells. **Glia**. 2019;67(6):1017-1035. doi:10.1002/glia.23571

Yokoyama C, Okamura H, Nakajima T, Taguchi J, Iyata Y. Autoradiographic distribution of [3H]YM-09151-2, a high-affinity and selective antagonist ligand for the dopamine D2 receptor group, in the rat brain and spinal cord. **J Comp Neurol**. 1994 Jun 1;344(1):121-36. doi: 10.1002/cne.903440109. PMID: 7914895.

Yoosefian M, Rahmanifar E, Etmnan N. Nanocarrier for levodopa Parkinson therapeutic drug; comprehensive benserazide analysis. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**. 2018;46(sup1):434-446. doi:10.1080/21691401.2018.1430583

Zonta, M., Angulo, M.C., Gobbo, S., Rosengarten, B., Hossmann, K-A., Pozzan, T. e Carmignoto, G. (2003) Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation. **Nature Neurosc.**, 6: 43-50.

## ANEXO A – análise comportamental

---

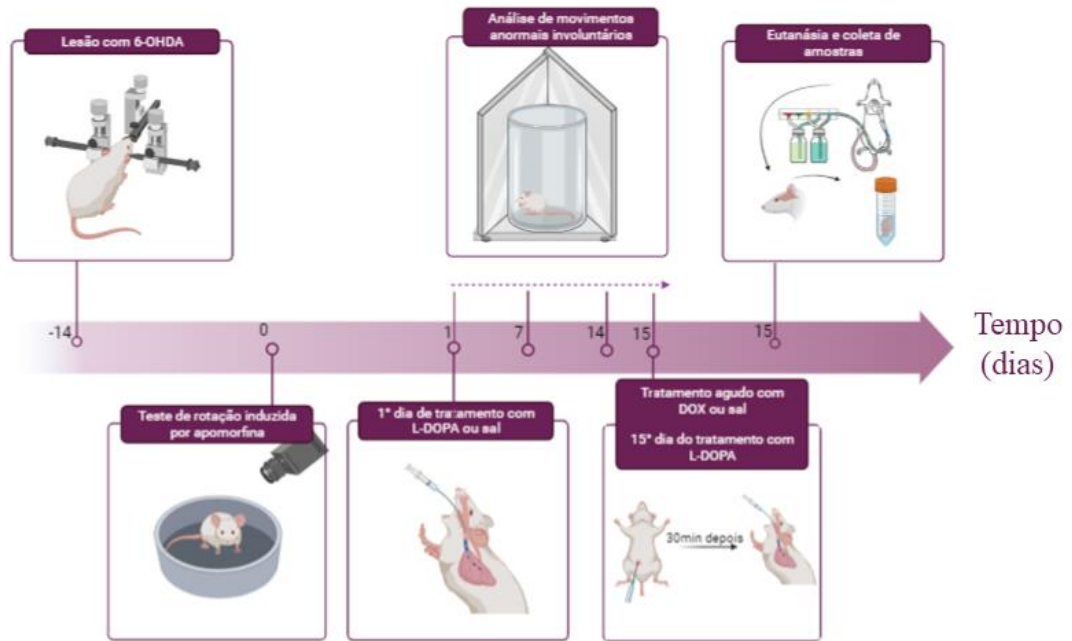
## Métodos

Animais: Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos *Wistar* (200 a 250 gramas) que foram alojados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP USP. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada ( $23^{\circ}\text{C} \pm 1$ ), sistema de exaustão de ar e ciclo claro/escuro de 12 horas. Foram fornecidas ração padrão e água filtrada à vontade. Os animais foram mantidos em grupos de 3 animais em caixa moradia com dimensões de 40x33x17cm, área total de 1394 cm<sup>2</sup>. Os procedimentos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP - Processo 2016.1.667.58.4) e estavam de acordo com as diretrizes determinadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento animal e reduzir o número de animais utilizados no trabalho.

Delineamento experimental: A descrição dos grupos e os delineamentos experimentais são apresentados a seguir e na figura 14 (tratamento agudo) e 15 (tratamento crônico).

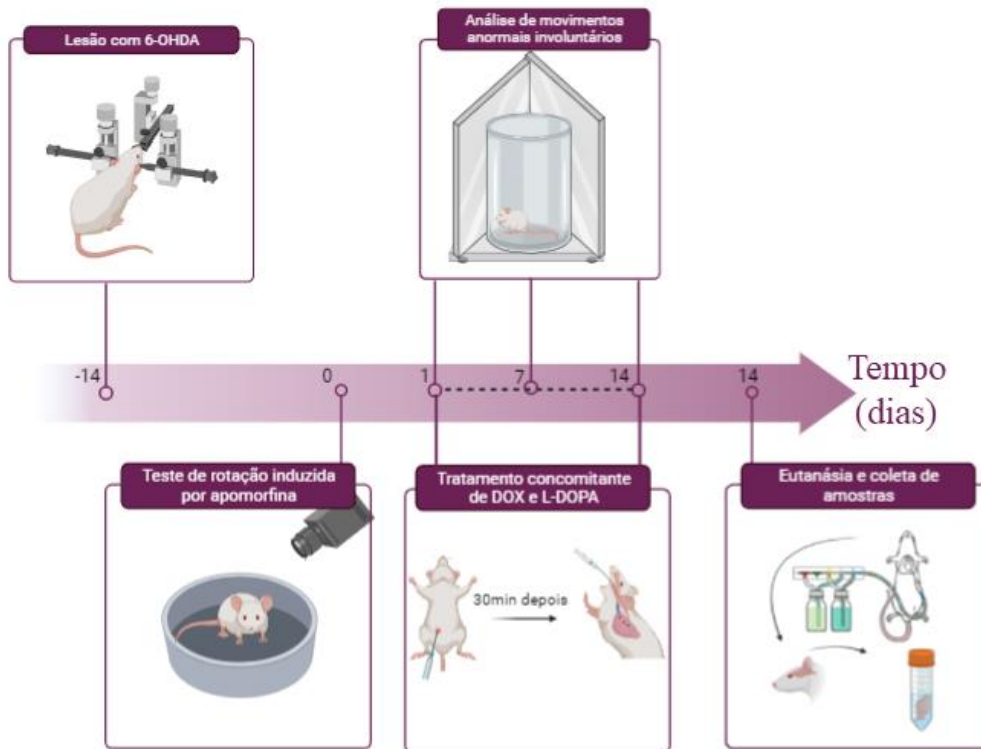
- Grupo 6-OHDA: lesionados tratados com salina (n=8-10)
- Grupo 6-OHDA+L-DOPA: lesionados e tratados cronicamente com L-DOPA por 15 dias (n=8-10)
- Grupo 6-OHDA+DOXag: lesionados e tratados com uma única dose de doxiciclina (n=8-10)
- Grupo 6-OHDA+L-DOPA+DOXag: lesionados, tratados cronicamente com L-DOPA por 15 dias e dose única de doxiciclina no 15º dia, 30 min antes da L-DOPA (n=8-10)
- Grupo 6-OHDA+DOXcr: lesionados e tratados cronicamente com doxiciclina por 15 dias (n=8-10)
- Grupo 6-OHDA+L-DOPA+DOXcr: lesionados, tratados cronicamente com L-DOPA concomitantemente com doxiciclina, 30 min antes da L-DOPA, por 15 dias (n=8-10).

Figura 14: Delineamento experimental para tratamento crônico com L-DOPA e agudo com DOX.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15: Delineamento experimental para tratamento crônico e concomitante com DOX e L-DOPA.



Fonte: elaborado pelo autor.

Cirurgia para indução da lesão: Para a lesão da via nigroestriatal os animais foram anestesiados com tribromoetanol ( $1\text{ml}\cdot\text{kg}^{-1}$ , i.p) e posicionados no aparelho estereotáxico. Foi administrada uma única injeção de  $2,5\ \mu\text{l}$  de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial (FPM) direito nas seguintes coordenadas: anteroposterior (AP): - 4,3 partindo do bregma; latero-lateral (LL): -1,6 da linha média e dorso-ventral (DV): - 8,3 a partir do crânio, seguindo o atlas de Paxinos e Watson, 2006. A 6-OHDA foi injetada a uma velocidade de  $1\ \mu\text{l}/\text{min}$  e a cânula foi mantida imóvel por um tempo adicional de 3 min para evitar refluxo da droga. Ao final da cirurgia os animais receberam injeção intramuscular de pentabiótico veterinário para animais de pequeno porte  $0,2\ \text{ml}$  (Forte Dodge Saúde Animal LTDA) e foram observados até recuperação da anestesia.

Teste comportamental rotatório: Realizado 15 dias após a lesão unilateral do estriado, sua análise consiste em observar e quantificar o número de giros de  $360^\circ$  no sentido contralateral à lesão durante 45 minutos após a administração subcutânea de apomorfina ( $0,05\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ). Este teste foi realizado para confirmação da indução do modelo parkinsoniano no animal.

Análise da LID: Após a micro injeção de 6-OHDA e a administração da L-DOPA por 15 dias, foi aferida a intensidade do comportamento discinético dos animais. O observador não sabia a qual grupo o animal pertencia, e deu uma pontuação para os movimentos anormais involuntários de acordo com a escala descrita por Anderson et al. (1999), Cenci e Lundblat (2007) e modificada por Padovan-Neto et al. (2009). A LID foi avaliada ao longo de 1 minuto, com intervalos de 20 minutos entre uma medição e outra, por um período total de 180 minutos após a administração da L-DOPA. Os comportamentos avaliados foram: (a) distonia axial; (b) discinesia do membro anterior; (c) discinesia orofacial; e (d) comportamento rotatório. A escala prevê uma classificação que varia de acordo com a gravidade e amplitude dos movimentos involuntários, que varia de 0 a 4 (onde 0=ausente, 1=ocasional, 2=frequente, 3=contínuo, porém interrompido por uma distração sensorial, 4=contínuo, severo e não suprimível).

Eutanásia e coleta de amostras: Os animais foram anestesiados com tribromoetanol ( $1,5\text{mg}/\text{kg}$ , i.p) e receberam por meio da artéria aorta a infusão de 80 – 100 ml de solução salina 0,9% contendo heparina ( $200\ \mu\text{L}$  de heparina 25000 UI por litro de solução) e nitrito de sódio ( $1\text{g}/\text{L}$  de solução), seguida por um volume de 80 – 150 ml de PFA 4% (pH 7,4, SigmaAldrich, St. Louis, MO, USA). O estriado e substância negra foram dissecados e incubados em solução de Somogy por 48h.

Após este período, o tecido foi incubado em solução de Sacarose 30%, para a desidratação. Após este evento, o tecido foi congelado em isopentano à -40°C para posterior armazenamento no freezer à -80°C, até que foram seccionados no criostato. As secções foram armazenadas em solução anticongelante.

Análise estatística: O teste de Mann-Whitney investigou as diferenças entre os tratamentos na análise da discinesia. A ANOVA de uma via foi utilizada para análise do teste de rotação com o teste post hoc de Bonferroni. Uma ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni, foi realizada para analisar os resultados de imunohistoquímica.

O programa GraphPad Prism 8.0 foi utilizado para a realização dos cálculos estatísticos e para as análises comportamentais e moleculares, os testes apropriados foram adotados conforme a criação dos grupos experimentais e respostas das análises. O nível de significância adotado foi  $p < 0,05$ .

Calculamos o número amostral considerando testes pilotos realizados no laboratório para o estabelecimento do desvio padrão ou as frequências populacionais da variável. Utilizamos a seguinte fórmula para calcular o tamanho da amostra (n) para que se obtenha uma estimativa confiável da média populacional (de acordo com Miot, 2011 - J Vasc Bras 2011, Vol. 10, Nº 4):

$$n = \left( \frac{z_{\alpha/2} \cdot \sigma}{E} \right)^2$$

Onde:

n – tamanho da amostra;

$Z_{\alpha/2}$  – valor crítico para o grau de confiança desejado, usualmente: 1,96 (95%);

$\delta$  – desvio padrão populacional da variável;

E = Diferença máxima estimada entre a média amostral e a verdadeira média populacional. É a margem de erro ou erro máximo de estimativa.

Para nosso desenho experimental, obtivemos o seguinte cálculo:

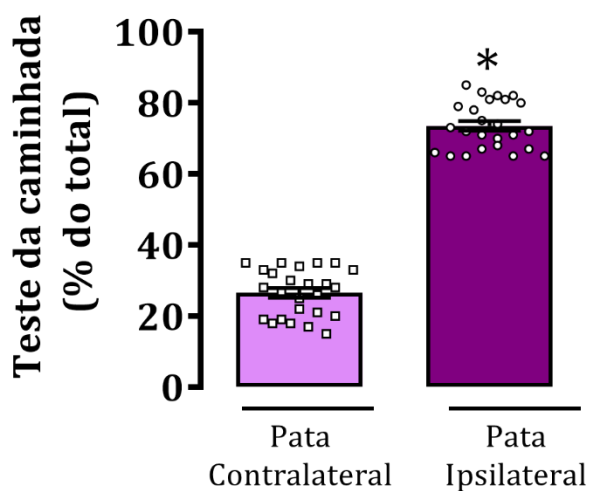
$n = (1,96 \times 8/5)^2 = 9,8$  (arredondamento para 10 ratos por grupo).

## Resultados

### Análise da lesão de neurônios dopaminérgicos por avaliação de comportamento motor e imunorreatividade para a enzima TH no estriado e SN no cérebro de ratos

Para verificar se os animais que receberam a neurotoxina 6-OHDA no feixe prosencefálico medial apresentaram intensidade de perda de neurônios e terminais dopaminérgicos, similar utilizamos dois testes comportamentais que indicam perda de dopamina no estriado e SN: o teste da caminhada e o teste da rotação induzida por apomorfina. No teste da caminhada, todos os grupos experimentais apresentaram índices reduzidos no uso da pata anterior contralateral à lesão (tratamento:  $F(5, 24) = 5,765$ ,  $p < 0,05$ ) em comparação com a pata do lado ipsilateral à lesão (lado:  $F(1, 24) = 52,81$ ,  $p < 0,05$ ; interação:  $F(5, 24) = 2,897$ ,  $p < 0,05$ ), indicando comprometimento motor derivado da lesão (figura 16).

Figura 16: Teste da caminhada.



Todos os grupos experimentais apresentaram índices similares de uso da pata anterior contralateral à lesão (tratamento:  $F(5, 24) = 5,765$ ,  $p < 0,05$ ) – reduzidos em comparação ao lado ipsilateral (lado:  $F(1, 24) = 52,81$ ,  $p < 0,05$ ; interação:  $F(5, 24) = 2,897$ ,  $p < 0,05$ ), indicando comprometimento motor derivado da lesão.

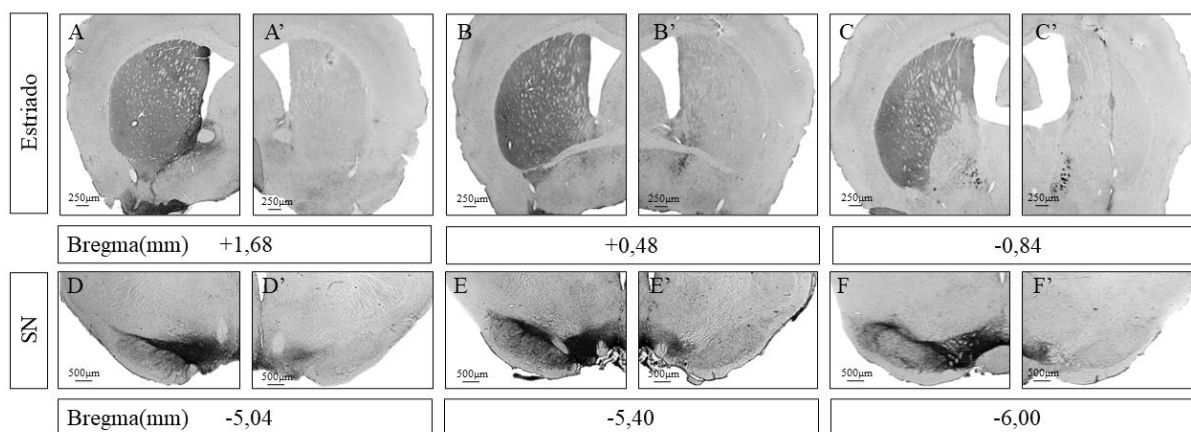
No teste de rotação por apomorfina, apenas os ratos que apresentaram mais de 90 rotações contralaterais totais (lado esquerdo) durante 45 minutos foram selecionados para o estudo ( $148,3 \pm 21,06$ ). De acordo com Cenci et al., (1998) e Lundblad et al., (2004), os ratos que atendem a esse critério possuem depleção de mais de 95% da dopamina estriatal.

Após os testes comportamentais a lesão dopaminérgica foi analisada pela reação de imuno-histoquímica para a enzima TH. Para determinar a extensão da denervação



dopaminérgica foi realizada uma análise qualitativa da perda de terminais dopaminérgicos no estriado e de corpos celulares na substância negra e estriado por meio da imunohistoquímica para TH. A microinjeção de 6-OHDA no feixe prosencefálico medial promoveu diminuição intensa na marcação de fibras na área dorsolateral e ventral do estriado e uma forte diminuição dos neurônios TH-imunopositivos ao longo de toda a extensão rostro-caudal da substância negra (figura 17).

Figura 17: Fotomicrografia de secções coronais de estriado e SN ilustrando a perda de imunomarcção TH positiva.



Grupo 6-OHDA, fibras estriatais (A – C; A' – C'), e neurônios positivos para TH na substância negra (D – F; D' – F'). A', B', C', D', E' e F' representam o lado ipsilateral a lesão.

### O tratamento com doxiciclina atenuou e previniu o desenvolvimento da discinesia induzida pela L-DOPA

Durante o tratamento prolongado com L-DOPA, 90% dos ratos desenvolveram movimentos involuntários anormais (AIMs), que afetaram o membro dianteiro contralateral a lesão, estruturas orofaciais, bem como o tronco (tabela 7).

#### *A aplicação aguda de doxiciclina reduziu a discinesia já estabelecida pela L-DOPA*

A administração aguda de DOX, reduziu em 86% ( $F_{(2,37,21,49)} = 11.36$ ,  $p < 0,001$ ) a pontuação total máxima de AIMs (Tabela 6, 6-OHDA+salina+L-DOPA (14° dia de tratamento) =  $45.95 \pm 5.674$  versus 6-OHDA+DOXag+L-DOPA (15° dia de tratamento) =  $6.60 \pm 4.118$ ). Os animais lesionados tratados apenas com salina ou DOX não desenvolveram AIMs (dados não apresentados).

Tabela 9: Efeito do tratamento agudo com DOX sobre LID

DIA	Distonia axial, discinesia do membro anterior, discinesia orofacial TOTAL
1	48.70±7.672
7	54.80±7.164
14	45.95±5.674
15	6.60±4.118* <b>Doxiciclina foi aplicada no animal 30 min antes da L-DOPA</b>

A administração aguda de DOX reduziu a discinesia induzida por L-DOPA. Os animais receberam durante 14 dias apenas L-DOPA (20 mg·kg<sup>-1</sup>, via oral - gavagem), e no 15º dia uma injeção intraperitoneal de DOX (40 mg·kg<sup>-1</sup>) 30 minutos antes da administração da L-DOPA. Escores (1 a 4) atribuídos de acordo com o tempo de incidência de cada um dos subtipos de movimentos, distonia axial, discinesia do membro anterior e discinesia orofacial (média dos escores ± EPM). A análise foi realizada durante 1 minuto, a cada 20 minutos, de 20 a 180 minutos após a administração de L-DOPA nos dias 1, 7, 14 e 15 de tratamento. \* indica diferença significativa em relação ao 14º dia de tratamento. (p < 0.01). Fonte: elaborado pelo autor.

*A aplicação de doxiciclina concomitante à L-DOPA preveniu o desenvolvimento da discinesia*

O tratamento de animais parkinsonianos com L-DOPA induziu o aparecimento de discinesia (grupo 6-OHDA+salina+L-DOPA). A administração concomitante de DOX com L-DOPA (grupo 6-OHDA+DOXcr+L-DOPA) suprimiu significativamente o desenvolvimento de AIMs nos dias 1, 7 e 14 do tratamento ( $F_{(2,60)} = 22,68$ ,  $P < 0,0001$ ; tabela 7).

Tabela 10: Efeito do tratamento crônico com DOX sobre LID

Distonia axial, discinesia do membro anterior, discinesia orofacial		
DIA	Salina + L-DOPA	DOXcr + L-DOPA
1	59.91±5.831	0.727±0.304*
7	80.64±5.999	0.000±0.000*
14	124.3±8.381	0.000±0.000*

A administração de DOX (40 mg·kg<sup>-1</sup>, via intraperitoneal) 30 minutos antes da L-DOPA, impediu o desenvolvimento de LID. Os animais receberam durante 14 dias L-DOPA (20 mg·kg<sup>-1</sup>, via oral – gavagem; grupo salina + L-DOPA) ou tratamento concomitante de DOX (40 mg·kg<sup>-1</sup>, via intraperitoneal) 30 minutos antes da administração da L-DOPA (20 mg·kg<sup>-1</sup>, via oral – gavagem; grupo DOXcr + L-DOPA). Escores (1 a 4) atribuídos de acordo com o tempo de incidência de cada um dos subtipos de movimentos, distonia axial, discinesia do membro anterior e discinesia orofacial (média dos escores ± erro padrão da média). A análise foi realizada durante 1 minuto, a cada 20 minutos, de 20 a 180 minutos após a administração de L-DOPA nos dias 1, 7, 14 e 15 de tratamento. \* indica diferença significativa em relação ao grupo salina + L-DOPA no respectivo dia de tratamento). Fonte: elaborado pelo autor.