

**ANA FLAVIA TOSTES DA SILVA**

**EFEITO DO CLORETO DE LÍTIO NO MODELO DE DOENÇA  
DE PARKINSON POR 6-OHDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Humana) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

São Paulo

2021

**ANA FLAVIA TOSTES DA SILVA**

**EFEITO DO CLORETO DE LÍTIO NO MODELO DE DOENÇA  
DE PARKINSON POR 6-OHDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Humana) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto

Versão corrigida

São Paulo

2021

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Tostes da Silva, Ana Flavia

Efeito do cloreto de lítio no modelo de Doença de Parkinson por 6-OHDA / Ana Flavia Tostes da Silva; orientador Luiz Roberto Giorgetti de Britto. -- São Paulo, 2021.

103 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Doença de Parkinson. 2. Cloreto de lítio. 3. GSK-3B. 4. 6-OHDA. I. Giorgetti de Britto, Luiz Roberto , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato (a): Ana Flavia Tostes da Silva

Título da Dissertação/Tese: Efeito do cloreto de lítio no modelo de Doença de Parkinson por 6-OHDA

Orientador: Luiz Roberto Giorgetti de Britto

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o (a) candidato (a):

(    ) **Aprovado(a)**

(    ) **Reprovado(a)**

Examinador (a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador (a):            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                 Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Instituto  
de Ciências  
Biomédicas  
*Excelência em Ensino e Pesquisa*

Universidade de São Paulo  
**Comissão de Ética no  
Uso de Animais**

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da contribuição da GSK-3 $\beta$  em modelos de 6-OHDA na doença de Parkinson", protocolada sob o CEUA nº 7708010318, sob a responsabilidade de **Luiz Roberto Giorgetti de Britto e equipe; Ana Flavia Tostes da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 14/06/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the contribution of GSK-3 $\beta$  in 6-OHDA models in Parkinson's disease", utilizing 96 Heterogenics mice (96 males), protocol number CEUA 7708010318, under the responsibility of **Luiz Roberto Giorgetti de Britto and team; Ana Flavia Tostes da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 06/14/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **24 meses**

Depto/Setor: **Fisiologia E Biofísica**

Origem: **Biotério de matrizes de Camundongos do ICB**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **88 a 90 dias**

Linhagem: **C57BL / 6**

**N amostral: 96**

São Paulo, 30 de julho de 2021

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva

Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

## **DECLARAÇÃO DE NÃO MANIPULAÇÃO DE ANIMAIS APÓS 13/06/20**

À secretaria do programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana,

Eu, Ana Flavia Tostes da Silva, portadora do n° USP 10076571, aluna de mestrado no programa de pós-graduação em Fisiologia Humana da Universidade de São Paulo, orientada pelo Prof. Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto, venho por meio deste declarar que a manipulação de animais referente ao trabalho de mestrado intitulado “Efeito do cloreto de lítio no modelo de doença de Parkinson por 6-OHDA”, cadastrado sob o n° CEUA 7708010318, foi realizada somente até a data de **13/06/2020**.

*Ana Flavia Tostes da Silva*

Assinatura

## AGRADECIMENTOS

À Deus.

À minha mãe Leonice, ao meu pai Celso e à minha irmã Flaviane pelo apoio familiar, suporte financeiro e psicológico fundamentais durante o período de execução do mestrado.

Ao orientador Dr. Luiz Roberto Giorgetti de Britto pela confiança e apoio desde a parte escrita até a realização do projeto.

Ao Guilherme Lopes Gonçalves pela amizade, ajuda profissional e por acreditar no meu potencial desde o ano de 2011.

Ao Matheus Azevedo Barbosa pelo amor, apoio, força, companheirismo e ajuda em todos os experimentos no decorrer do mestrado.

À Maria Nathália pela amizade, auxílio na realização das metodologias (principalmente na RT-PCR) e aos seus importantes conselhos de como otimizar o que foi proposto no projeto.

Ao Adilson da Silva Alves pela sua companhia divertida, disponibilidade e por todo o amparo nos experimentos.

Ao professor José Cipolla Neto por ter aberto as portas do seu laboratório e por ter me concedido o uso do equipamento de RT-PCR.

Ao professor William Tadeu Lara Festuccia pela indicação de métodos que enriqueceram o atual trabalho.

A Professora Karina Thieme por gentilmente ter permitido o uso do fotodocumentador.

À CAPES por todo o auxílio financeiro concedido ao departamento durante o período da realização deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e verba PROEX (Programa de Excelência Acadêmica)

## **AGRADECIMENTOS**

À FAPESP pelo fornecimento da bolsa de estudo no nível de mestrado (nº do processo 2018/13015-0) em vigência durante o período de 2018 a 2020. Assim como, todo suporte para o desenvolvimento do projeto.



## RESUMO

TOSTES, A F. **Efeito do cloreto de lítio no modelo de Doença de Parkinson por 6-OHDA.** 2021. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Fisiologia Humana) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

**Introdução:** A doença de Parkinson (DP) é uma afecção neurodegenerativa cujo principal achado é a perda de neurônios dopaminérgicos na região da substância negra (SN) e de suas projeções que atingem o núcleo estriado. Além disso, a DP tem se destacado recentemente por ter sido considerada o distúrbio neurológico que teve o crescimento mais rápido em todo o mundo. Neste contexto surge uma notável preocupação em testar fármacos que apresentam potenciais efeitos neuroprotetores, como por exemplo, o cloreto de lítio (LiCl). O **objetivo** do atual estudo foi avaliar o efeito do LiCl nos neurônios dopaminérgicos e investigar a influência do tratamento com este composto na expressão da enzima Glicogênio Sintase Quinase-3  $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) nas regiões da SN e do estriado em um modelo de DP. **Métodos:** Para indução do modelo de DP, foi administrada a 6-OHDA na concentração de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  dissolvida em uma solução de NaCl 0,9% e ácido ascórbico 0,2%. A injeção da 6-OHDA foi realizada em dois pontos distintos do estriado nas seguintes coordenadas: Ponto 1: A (anterior): +1.0 mm; ML (médio-lateral): 2,0 mm em relação ao bregma e DV (dorsoventral): 2,9 mm em relação a dura-máter. Ponto 2: P (posterior): - 0,3 mm; ML: 2,3 mm em relação ao bregma e DV: 2,9 mm em relação a dura-máter. O volume total injetado da droga foi de 2  $\mu\text{l}$ . Para o tratamento com LiCl utilizou-se a concentração de 4 mmol (concentração capaz de inibir a enzima GSK-3 $\beta$  em modelos de camundongos), veiculados intraperitoneal por 13 dias. Em seguida, as amostras foram coletadas e avaliou-se a atividade da enzima GSK-3 $\beta$  na SN e no estriado pelas metodologias de imunohistoquímica, RT-PCR e immunoblotting. **Resultados:** Os resultados encontrados são indicativos de que a 6-OHDA promoveu a morte neuronal dopaminérgica na região da SN, evidenciada pela redução na expressão da enzima tirosina hidroxilase (TH) nos animais submetidos a injeção desta neurotoxina quando comparados aos animais controles. Além disso, os animais que receberam 6-OHDA apresentaram um aumento na expressão gênica de Caspase-3. Contudo, aqui relatamos que a indução de DP não foi sugestiva de que a 6-OHDA exerça um efeito significativo no mRNA da GSK-3 $\beta$  e nem na conformação ativa da enzima GSK-3 $\beta$  (Y216) nas regiões da SN e do núcleo estriado no 15º dia após a lesão. Já em relação ao tratamento com LiCl, tivemos uma redução na expressão de mRNA de AKT e de mRNA GSK-3 $\beta$  nos animais que foram tratados com este composto. Em contrapartida, obtivemos um aumento

da expressão de GSK-3 $\beta$  (Y216) que aparenta estar relacionada com a redução de mRNA de TH na SN dos animais que foram tratados com LiCl. Estes resultados são sugestivos de um novo mecanismo pelo qual ocorre a neurotoxicidade do LiCl na SN. **Análise estatística:** análise de variância ANOVA, *two-way* completamente randomizada, seguida por pós-teste de Bonferroni, realizados no software GraphPad Prism 8.2.1. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média. **Conclusão:** Nossos dados indicam que a GSK-3 $\beta$  (Y216) está presente nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da SN e que nesta região, o aumento da GSK-3 $\beta$  (Y216) apresenta uma correlação com redução de mRNA de TH apenas nos animais tratados com LiCl e não no modelo de DP. Estes resultados são sugestivos de que o tratamento LiCl a longo prazo apresenta um efeito antagônico deletério aos neurônios dopaminérgicos da SN dependente da fosforilação de GSK-3 $\beta$ , desafiando o uso do lítio como estratégia terapêutica para a DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Tirosina hidroxilase. GSK-3 $\beta$  (Y216). LiCl.

## ABSTRACT

TOSTES, A F. **Effect of lithium chloride in 6-OHDA Parkinson's Disease model.** 2021. 98 p. Dissertation (Mestrado em Ciências - Fisiologia Humana) – Biomedical Sciences Institute, University of São Paulo, São Paulo, 2021.

**Introduction:** Parkinson's Disease (PD) is a pathological alteration which consists mainly in the loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra (SN) and its projections to the striatum. Besides this, PD has been winning attention recently due to being considered the neurological disorder with the fastest growth in the world. In this context, a concern in testing drugs that may present potential neuroprotective effects, like lithium chloride (LiCl), raises. The **objective** of this study was to evaluate the effect of LiCl in dopaminergic neurons and investigate the influence of the treatment with this drug in the enzymatic expression of GSK-3 $\beta$  in the SN and striatum in a PD model. **Methodology:** To induce the PD model, 6-OHDA was administered in a 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  concentration, dissolved in a 0,9% NaCl and 0,2% ascorbic acid solution. The 6-OHDA injection was made in two distinct striatum points at the following coordinates: Point 1: A (anterior): +1.0 mm; ML (mediolateral): 2.0 mm in relation to bregma and DV (dorsoventral): 2.9 mm in relation to the dura mater. Point 2: P (posterior): -0.3 mm; ML: 2.3 mm in relation to bregma and DV: 2.9 mm in relation to the dura mater. The injected volume of the drug was 2  $\mu\text{l}$ . To the LiCl treatment, a 4 mmol/kg/day dose (capable of inhibit the GSK-3 $\beta$  enzyme in mice models) was used, vehiculated by intraperitoneal injection for 13 days. Following, samples were collected and the enzymatic activity of the GSK-3 $\beta$  in the SN and striatum was evaluated by immunohistochemistry, RT-PCR and Immunoblotting methodologies. **Results:** The results found indicate that 6-OHDA promoted dopaminergic neuronal death in the SN region, evidenced by the tyrosine hydroxylase (TH) enzymatic expression reduction in the animals subjected to this neurotoxin injection, when compared to control animals. Besides this, animals that received 6-OHDA presented an increase in the Caspase-3 genic expression. Although here we relate that the PD induction was not suggestive that 6-OHDA exerts a significative effect in GSK-3 $\beta$  mRNA nor in the active conformation of the GSK-3 $\beta$  (Y216) enzyme in the regions of the SN and striatum at the 15th day after the lesion. About the LiCl treatment, we had a reduction in the AKT mRNA and GSK-3 $\beta$  mRNA in animals treated with this compound. As a counterpoint, we had an increase in the GSK-3 $\beta$  (Y216) expression that may be related to the TH mRNA reduction at the SN of animals treated with LiCl. These results are

suggestive of a new mechanism of how LiCl neurotoxicity occurs. **Statistical analysis:** two-way ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test, made using GraphPad Prism 8.2.1. p-values < 0.05 were considered statistically significant. Results were shown as mean  $\pm$  standard error of the mean. **Conclusion:** Our data points that GSK-3 $\beta$  (Y216) is present in the cell bodies of dopaminergic neurons of the SN and that, in this region, the increase of GSK-3 $\beta$  (Y216) shows a correlation with the TH mRNA only in animals treated with LiCl and not with the PD model. These results are suggestive that the long-term LiCl treatment presents an antagonistic deleterious GSK-3 $\beta$  phosphorylation-dependent effect to dopaminergic neurons in the SN, challenging LiCl use as a therapeutic strategy to PD.

**Keywords:** Parkinson's Disease. Tyrosine hydroxylase. GSK-3  $\beta$  (Y216). LiCl.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sequências de primers utilizados para a realização da RT-PCR.....	47
---	----

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Relação entre a complexa circuitaria formada pelo córtex, núcleos da base, tálamo, medula e as vias de neurotransmissores envolvidas.....	26
<b>Figura 2</b> – Via direta e a via indireta do circuito motor em um modelo fisiológico e na Doença de Parkinson.....	28
<b>Figura 3</b> – Sequência das regiões afetadas pela injeção unilateral de 6-OHDA intraestriatal.....	29
<b>Figura 4</b> – Representação esquemática das isoformas da GSK-3: a enzima GSK-3 $\alpha$ e a enzima GSK-3 $\beta$ .....	32
<b>Figura 5</b> – Desenho experimental da análise do processo neurodegenerativo e do tratamento com o LiCl em camundongos C57BL/6.....	43
<b>Figura 6</b> – Figura representativa da progressão da lesão induzida pela administração da concentração de 12 $\mu$ g de 6-OHDA no hemisfério lesionado em comparação ao não lesionado, nas coordenadas padronizadas por Cheng e colaboradores, ao longo do estriado de um camundongo C57BL/6J.....	51
<b>Figura 7</b> – Imagem representativa da marcação de TH no estriado e na substância negra de camundongo C57BL/6J 15 dias após a administração de 4 $\mu$ g de 6-OHDA veiculadas através de uma microseringa Hamilton®, nas coordenadas estereotáticas padronizadas.....	53
<b>Figura 8</b> – Local da injeção de 6-OHDA situada entre a região do estriado dorsal e do estriado ventral 24 horas após a administração da 6-OHDA obtida pela fluorescência de TH.....	54
<b>Figura 9</b> – Imagem representativa da lesão retrógrada na região do mesencéfalo de camundongo C57BL/6J, 24 horas após a administração de 6-OHDA.....	54
<b>Figura 10</b> – Imagens ilustrativas da dupla marcação de TH e pGSK-3 ativa, na região da SNpc de um camundongo C57BL/6J, no qual, foi injetada apenas solução salina nas coordenadas estereotáticas padronizadas.....	55
<b>Figura 11</b> – Micrografias confocais representativas da SNpc de camundongo C57BL/6J, demonstrando a dupla marcação entre TH e pGSK-3 na sua forma ativa (Y216 eY279) nos respectivos grupos: Salina IC, 6-OHDA IC, Salina IC + LiCl IP e 6-OHDA IC + LiCl IP.....	56

<b>Figura 12</b> – Gráfico da expressão gênica de TH na região da Substância Negra. Os resultados de PCR quantitativo foram analisados através do método de $\Delta\Delta CT$ .....	57
<b>Figura 13</b> – Gráficos da expressão gênica de AKT, GSK-3 $\beta$ e Caspase-3 nas regiões do Estriado e da Substância Negra.....	59
<b>Figura 14</b> – Análise da expressão de GAPDH no hemisfério experimental direito no estriado (striatum) e da substância negra (substantia nigra) por <i>immunoblotting</i> .....	61
<b>Figura 15</b> – Análise da expressão proteica de GSK-3, GSK-3 $\alpha$ e GSK-3 $\beta$ normalizadas por GAPDH no hemisfério experimental direito no estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i> .....	63
<b>Figura 16</b> – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$ e pGSK-3 $\beta$ normalizadas por GAPDH no hemisfério experimental nas regiões do estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i> .....	64
<b>Figura 17</b> – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$ e pGSK-3 $\beta$ normalizadas por GSK-3 no hemisfério experimental direito do estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i> .....	66
<b>Figura 18</b> – Análise da expressão de pGSK-3 $\alpha$ normalizadas por GSK-3 $\alpha$ e pGSK-3 $\beta$ normalizadas por GSK-3 $\beta$ no hemisfério experimental direito do estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i> .....	67
<b>Figura 19</b> – Análise da expressão de GSK-3, GSK-3 $\alpha$ e GSK-3 $\beta$ normalizadas por GAPDH na substância negra (substantia nigra) por <i>immunoblotting</i> .....	69
<b>Figura 20</b> – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$ e pGSK-3 $\beta$ normalizadas por GAPDH na substância negra (substantia nigra) direita por <i>immunoblotting</i> .....	70
<b>Figura 21</b> – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$ e pGSK-3 $\beta$ normalizadas por GSK-3 na substância negra (substantia nigra) direita por <i>immunoblotting</i> .....	72
<b>Figura 22</b> – Análise da expressão de pGSK-3 $\alpha$ normalizadas por GSK-3 $\alpha$ e pGSK-3 $\beta$ normalizadas por GSK-3 $\beta$ na substância negra (substantia nigra) direita por <i>immunoblotting</i> .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 3NP** – Ácido 3-nitropropilônico
- 6-OHDA** – 6-hidroxi-dopamina
- A** – Anterior
- ABC** – Complexo Avidina-Biotina
- AKT** – Proteína Quinase B
- AMC** – Área Motora Cingulada
- AMS** – Área motora suplementar
- APP** – Proteína precursora amilóide
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- BCA** – Ácido Bicinchonínico
- bFGF** – Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
- BSA** – Albumina de Soro Bovino
- CEUA-ICB/USP** – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo
- CM** – Núcleo Centromedial
- CPM** – Córtex pré-motor
- CPu** – Caudado-putamen
- DA** – Doença de Alzheimer
- DAB** – Tetracloroeto de diaminobenzidina
- DAOs** – Dopamina-quinonas
- DAT** – Sistema de transporte das catecolaminas
- DAT** – Sistema de transporte das catecolaminas
- DMT1** – Transportador de metal divalente 1
- DP** – Doença de Parkinson
- DV** – Dorsoventral
- EROs** – Espécies Reativas de Oxigênio
- Fe<sup>2+</sup>** – Íon Ferro II
- GPe** – Globo pálido externo
- GPi** – Globo pálido interno
- GSK-3** – Glicogênio Sintase Quinase 3
- GSK-3 $\alpha$**  – Glicogênio Sintase Quinase 3 $\alpha$
- GSK-3 $\beta$**  – Glicogênio Sintase Quinase 3 $\beta$
- IC** – Intracerebral



**IP** – Intraperitoneal

**LBS** – Corpos de Lewy

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**M1** – Córtex motor primário

**MAP** – Proteínas associadas aos microtúbulos

**MAPKs** – Proteínas quinase ativadas por mitógeno

**MFB** – Feixe do Prosencéfalo Medial

**Mg<sup>2+</sup>** – Íon Magnésio

**ML** – Médio Lateral

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

**mTOR** – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos

**NB** – Núcleos da base

**NEM** – Neurônios Espinhosos Médios

**NPP** – Núcleo Pedunculopontino

**NST** – Núcleos subtalâmicos

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**P** – Posterior

**PB 0,1 M** – Tampão fosfato 0,1 M

**PFA** – Paraformaldeído

**PKA** – Proteína Quinase A

**PKC** – Proteína Quinase C

**PM** – Peso molecular

**PM** – Peso Molecular

**PVDF** – Polivinilideno

**qPCR** – PCR quantitativo

**S9** – Serina 9

**SN** – Substância Negra

**SNC** – Sistema Nervoso Central

**SNpc** – Substância Negra pars compacta

**SNpr** – Substância negra pars reticulada

**TB** – Transtorno bipolar

**TBS-T** – Tris-salina-Tween 0,1% 1x

**TH** – Tirosina hidroxilase

**VA** – Núcleo ventral anterior do tálamo

**VL** – Núcleo ventral lateral do tálamo

**VTA** – Área Tegmental Ventral

**Y216** – Tirosina 216

**Y279** – Tirosina 279

**$\alpha$ -Syn** –  $\alpha$ -Sinucleína

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>1.1 Doenças neurodegenerativas</b> .....	<b>21</b>
<b>1.2 Doença de Parkinson</b> .....	<b>21</b>
1.2.1 <i>O controle motor realizado pelos núcleos da base e a fisiopatologia da DP</i> .....	25
1.2.2 <i>Modelo animal utilizado para estudar a Doença de Parkinson</i> .....	28
<b>1.3 A enzima GSK-3<math>\beta</math></b> .....	<b>31</b>
1.3.1 <i>A regulação da atividade da enzima GSK-3<math>\beta</math> por proteínas quinases</i> .....	33
1.3.2 <i>Função serina/treonina quinase da enzima GSK-3<math>\beta</math> nos substratos Tau e <math>\alpha</math>-Syn</i> .....	34
<b>1.4 Mecanismos modulatórios do lítio na atividade da enzima GSK-3<math>\beta</math></b> .....	<b>36</b>
<b>2 OBJETIVO</b> .....	<b>40</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>41</b>
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1 Animais</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2 Delineamento experimental</b> .....	<b>42</b>
<b>4.4 Indução do modelo de Doença de Parkinson por meio da administração de 6-OHDA</b> .....	<b>43</b>
<b>4.5 Tratamento com o cloreto de lítio intraperitoneal</b> .....	<b>44</b>
<b>4.6 Imuno-histoquímica</b> .....	<b>44</b>
<b>4.7 Real Time PCR</b> .....	<b>46</b>
4.7.1 <i>Extração de RNA</i> .....	46
4.7.2 <i>Purificação do RNA</i> .....	46
4.7.3 <i>Síntese de cDNA</i> .....	47
4.7.4 <i>Reações de PCR quantitativo (qPCR)</i> .....	47
<b>4.8 Immunoblotting</b> .....	<b>48</b>
<b>5 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>50</b>
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
<b>6.1 Padronização da concentração de 6-OHDA</b> .....	<b>51</b>
<b>6.2 Lesão induzida por 6-OHDA 24 horas após o procedimento cirúrgico</b> .....	<b>53</b>
<b>6.3 Localização da pGSK-3 ativa no mesencéfalo de camundongos C57BL/6J</b> .....	<b>55</b>
<b>6.4 Análise da expressão gênica de TH, AKT, GSK-3<math>\beta</math> e Caspase-3 por RT-PCR:</b> .....	<b>57</b>
<b>6.5 Análise da expressão proteica do GAPDH para o seu uso como proteína normalizadora:</b> .....	<b>61</b>
<b>6.6 Análise da expressão proteica de GSK-3, GSK-3<math>\alpha</math>, GSK-3<math>\beta</math>, pGSK-3<math>\alpha</math> (Y279) e pGSK-3<math>\beta</math> (Y216) no estriado:</b> .....	<b>62</b>

<b>6.7 Análise da expressão proteica GSK-3, GSK-3<math>\alpha</math>, GSK-3<math>\beta</math>, pGSK-3<math>\alpha</math> (Y279) e pGSK-3<math>\beta</math> (Y216) na substância negra: .....</b>	<b>68</b>
<b>7 DISCUSSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>86</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Doenças neurodegenerativas**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de indivíduos com 65 anos ou mais devem totalizar cerca de 1,5 bilhões de pessoas em 2050. Em vista disso, acredita-se que um em cada seis indivíduos terá a idade igual ou maior que 65 anos no mundo (NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC; AFFAIRS; DIVISION, 2020). Apesar deste índice retratar um quadro indicativo do aumento da qualidade de vida da população mundial, a elevada expectativa de vida torna estes indivíduos susceptíveis a algumas afecções relacionadas ao envelhecimento, como por exemplo as doenças neurodegenerativas. A possível explicação dada para o envelhecimento ser considerado o principal fator de risco da neurodegeneração, está na existência de algumas características que são mais visíveis com o passar da idade e que tornam propícia a morte neuronal. Dentre estas particularidades podem ser mencionadas: a instabilidade genômica, o atrito telomérico, o conjunto de alterações epigenéticas, a perda da homeostase proteica, a disfunção mitocondrial (principalmente envolvendo os complexos mitocondriais), a senescência celular, a exaustão na produção de células-tronco e um déficit da comunicação dentro da célula. (MAYNARD et al., 2015; FEIGIN et al., 2017; HOU et al., 2019).

Quanto ao fenômeno da degeneração neuronal em si, é necessário que uma grande quantidade de células neuronais, permaneçam disfuncionais e/ou encaminhem para a morte celular. Neste caso, os sinais clínicos tornam-se evidentes e resultam em modificações dos comportamentos, disfunções cognitivas, entre outros sintomas. O que se sabe até hoje, é que a origem da perda neuronal possui causas multifatoriais e tem a capacidade de afetar alguns sistemas de neurotransmissores específicos, proporcionando uma certa vulnerabilidade neuronal seletiva. Além disso, a neurodegeneração tem uma progressão estereotipada nas regiões cerebrais e comumente gera o depósito de proteínas/organelas nos neurônios que estão vulneráveis ao processo de degeneração (BRICHTA; GREENGARD, 2014; FU; HARDY; DUFF, 2018; SOTO; PRITZKOW, 2018).

## **1.2 Doença de Parkinson**

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda patologia neurodegenerativa mais prevalente, ficando apenas depois da Doença de Alzheimer (DA) (DE LAU; BRETELER, 2006; FEIGIN

et al., 2017). No entanto o estudo da DP despertou recentemente um grande interesse por parte da comunidade científica, devido ao fato desta enfermidade ter sido considerada o distúrbio neurológico que teve o crescimento mais rápido em todo o mundo, atingindo todas as classes socioeconômicas e grupos étnicos. Quanto a etiologia da DP, mesmo sem apresentar uma origem específica comprovada, esta doença costuma se manifestar predominantemente na forma esporádica (por exposição crônica à pesticidas, herbicidas, químicos industriais e metais) ou em casos de predisposição genética nas formas familiares raras que estão presentes em apenas 5-10% dos casos (TYSNES; STORSTEIN, 2017). Apesar disso, existe uma correlação direta entre o aumento da prevalência/incidência da Doença de Parkinson versus a elevada taxa de envelhecimento da população mundial (PICON; BELTRAME, 2002; DORSEY et al., 2018a). Em percentual cerca de 1% dos indivíduos com idade acima de 60 anos estão acometidos pela DP e 4% dos indivíduos acima de 80 anos possuem esta patologia (PRINGSHEIM et al., 2014; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Todavia, o aumento acentuado da incidência e da prevalência do Parkinson ocorre por volta dos 65 anos de idade (“Neurological disorders: public health challenges”; DORSEY et al., 2018).

Embora a Doença de Parkinson tenha tido um crescimento global e apresentado uma maior relevância nos últimos anos, esta patologia foi descrita primordialmente no ano de 1817 por James Parkinson, no artigo intitulado de “An essay on the Shaking Palsy” (PARKINSON, 2002; PRZEDBORSKI, 2017). Neste trabalho, são relatadas as observações dos sintomas característicos da DP como por exemplo: o tremor de repouso; a bradicinesia; a rigidez muscular e a instabilidade postural. Sendo a DP uma afecção pertencente ao grupo das doenças neurodegenerativas, os achados mencionados por James Parkinson e colaboradores são ocasionados pela degeneração lenta, progressiva e multifatorial de cerca de 70% ou mais neurônios dopaminérgicos na região da substância negra *pars compacta* (SNpc) e de suas respectivas projeções que atingem o núcleo estriado (também conhecido como caudado-putamen (CPu)) compondo a via nigro-estriatal (DAVIE, 2008; BRICHTA; GREENGARD, 2014; MCGREGOR; NELSON, 2019).

Estas regiões são importantes centros reguladores do sistema motor e vinculam os achados neuro-anatômicos com a sintomatologia clínica. A depleção neuronal dopaminérgica na substância negra (SN) resulta na diminuição dos níveis de dopamina liberada no estriado e consequentemente gera o comprometimento das funções motoras executadas por estes núcleos.

Desta forma os sintomas motores estão predominantemente afetados na DP e costumam ser utilizados como critério diagnóstico até os dias de hoje (PICON; BELTRAME, 2002; POEWE et al., 2017; PONTONE et al., 2019; SZETO et al., 2020). No entanto a detecção baseada na sintomatologia motora, apesar de usual, é indicativa de um comprometimento neuronal amplo e na maioria dos casos esta situação é irreversível (WEBER; MOLLENHAUER, 2021). Assim, os tratamentos disponíveis atualmente têm dado prioridade a estratégias de reposição da dopamina e ao alívio dos sintomas da DP. Dessa maneira é pouco provável que a terapêutica empregada venha reverter ou estagnar a neurodegeneração por completo (POEWE et al., 2017; ELKOUZI et al., 2019; ARMSTRONG; OKUN, 2020).

Do ponto de vista neuropatológico, a DP é considerada uma patologia multifatorial cujos exatos mecanismos moleculares envolvidos na morte dopaminérgica são extremamente complexos e ainda não estão bem caracterizados. Entretanto existem muitos indícios de que o estresse oxidativo atue como maestro da neurodegeneração e que tenha um envolvimento direto com os outros pilares da morte dopaminérgica na SN. Sendo assim, a desregulação da atividade redox aumenta a probabilidade de surgir mutações espontâneas e as células se tornam mais vulneráveis a disfunções em processos fisiopatológicos. Estas alterações são comumente visualizadas no envelhecimento saudável e de forma acentuada na DP (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017; GUO et al., 2018).

Em vista disso, foi evidenciado que o desequilíbrio redox celular esteve presente na SNpc dos pacientes em estágio inicial da DP antes mesmo da perda considerável dos neurônios do sistema dopaminérgico (FERRER et al., 2011). As possíveis explicações envolvidas para esta constatação, estão no potencial de gerar radicais desemparelhados de maneira exacerbada da própria SN, proporcionando dessa forma, uma certa vulnerabilidade seletiva a neurodegeneração quando comparada a outros núcleos dopaminérgicos (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2017). Dentre os mecanismos responsáveis por promover o desbalanço redox no interior dos neurônios dopaminérgicos da SN podem ser mencionados: a elevada produção de energia (para atender o mandril axonal não mielinizado dos neurônios dopaminérgicos desta região, promover a manutenção da atividade marca-passo na SNpc e garantir a homeostase tamponante do cálcio bivalente); o metabolismo oxidativo e enzimático da dopamina responsável por gerar grandes quantidades de radicais livres; o acúmulo de ferro intracelular preferencial nesta região do cérebro e que está relacionado com a redução na atividade da ferritina (com a

capacidade de estocagem idade dependente); o ferro livre que por sua vez interage diretamente com o acúmulo de dopamina disponível e também produzem uma grande taxa de radicais desparelhados. Ademais, existem fortes evidências de que a agregação/disfunção proteica ( $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -Syn), TAU,  $\beta$ -amilóide), a disfunção mitocondrial, o estresse de retículo e a neuroinflamação podem exacerbar o estresse oxidativo nigral, bem como resultar na produção ainda mais acentuada de radicais livres que promovem a ativação direta e indireta de inúmeras vias sinalizadoras de morte neuronal dopaminérgica na SN (BLESA et al., 2015; AARSLAND et al., 2017; DUCE et al., 2017; POEWE et al., 2017; PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Além da neurodegeneração dopaminérgica clássica da DP, foi observado que antecedendo/simultâneo a este processo, ocorre uma depleção neuronal estereotipada em outras regiões cerebrais: como no córtex; nos núcleos do tronco cerebral e em neurônios periféricos (como os do plexo mioentérico). Em conjunto, estas regiões afetadas, culminam nos sintomas não motores que podem apresentar características prodômicas (envolvendo o distúrbio do sono, alterações no funcionamento do intestino, alterações do olfato, etc.), gerar alterações psicológicas (depressão, ansiedade, alucinações), danos cognitivos (como o comprometimento da percepção, da memória, da linguagem, etc.) e contribuir para instauração de quadros de demência em estágios mais avançado da DP. Apesar das alterações não motoras terem sido negligenciadas por tanto tempo, foram recentemente incluídas no diagnóstico dos pacientes com DP devido a sua associação ao prejuízo na qualidade de vida, a elevação nos índices de mortalidade e o aumento nas taxas de internação destes indivíduos. E por fim, os sintomas não motores mencionados costumam ser alternativamente tratados assim como os sintomas motores, objetivando melhorar o bem-estar do indivíduo acometido pela Doença de Parkinson (PICON; BELTRAME, 2002; DE LAU et al., 2005; OGUH; VIDENOVIC, 2012; AARSLAND et al., 2017; POEWE et al., 2017; SCHAPIRA; CHAUDHURI; JENNER, 2017; PONTONE et al., 2019; SZETO et al., 2020; RIGO; LEVANDOVSKI; TSCHIEDEL, 2021; WEBER; MOLLENHAUER, 2021; YOON; MONCHI, 2021a).

Apesar de ter ocorrido muitos avanços no tratamento da DP, não existem ainda terapias eficazes no combate a neurodegeneração, gerando uma importante lacuna a ser preenchida e que carece da pesquisa de novos tratamentos visionários em relação a estagnação ou até mesmo



a reversão da perda de neurônios dopaminérgicos na SN e das projeções que atingem o núcleo estriado (VALLÉE; VALLÉE; LECARPENTIER, 2021).

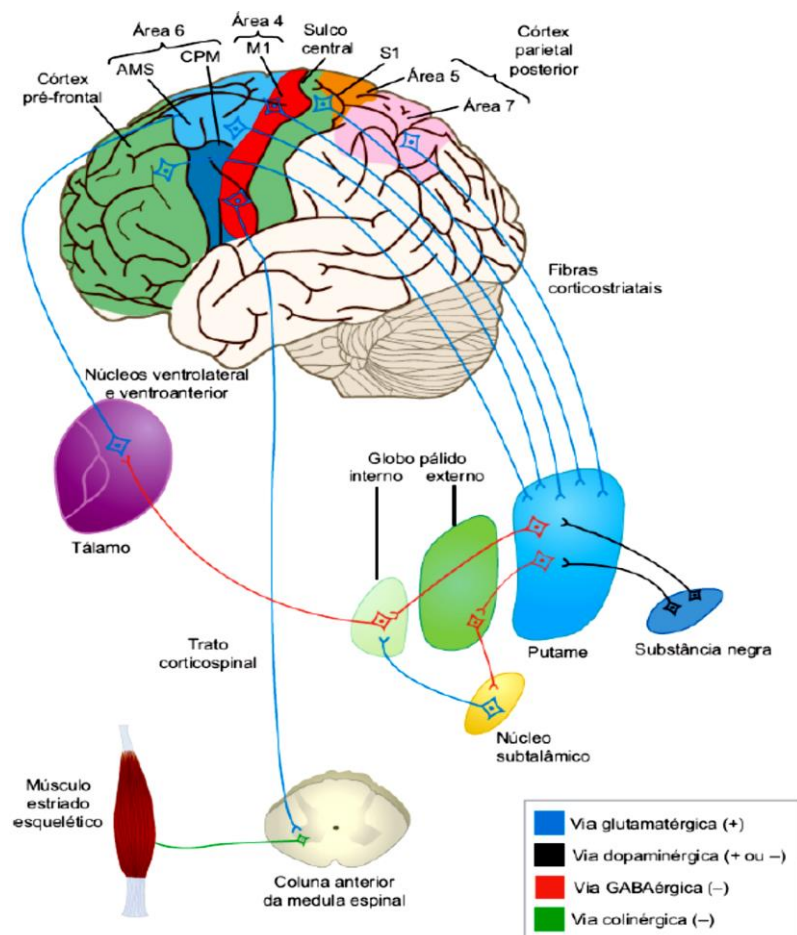
### *1.2.1 O controle motor realizado pelos núcleos da base e a fisiopatologia da DP*

Os núcleos da base são um conjunto de circuitos paralelos envolvidos no controle motor e em funções executivas (aprendizagem motora, controle comportamental e emoção). Entretanto para que ocorra o movimento voluntário é necessário que exista uma complexa comunicação entre as redes neurais formadas pelos núcleos da base (NB), córtex e tálamo (Figura 1).

OS NB têm funções envolvidas na iniciação e no controle das ações sendo constituídos por: estriado (CPu), globo pálido interno (GPi), globo pálido externo (GPe), núcleos subtalâmicos (NST), substância negra *pars compacta* (SNpc) e substância negra *pars reticulada* (SNpr). Anatomicamente os NB apresentam uma forte entrada de neurônios corticais que atingem poucos neurônios de saída subcortical e os neurônios que retornam ao córtex. Esta característica é indicativa de uma função de filtro que é extremamente importante na execução do movimento voluntário (POEWE et al., 2017; FLORIO et al., 2018). Além disso, de forma complementar, as áreas corticais motoras são responsáveis pelo planejamento e a realização dos movimentos, conectando-se com o núcleo estriado por meio de aferências glutamatérgicas (SINGH, 2018). E o tálamo por sua vez, conduz as informações desta complexa circuitaria de volta ao córtex e ao estriado (GRILLNER; ROBERTSON, 2016).

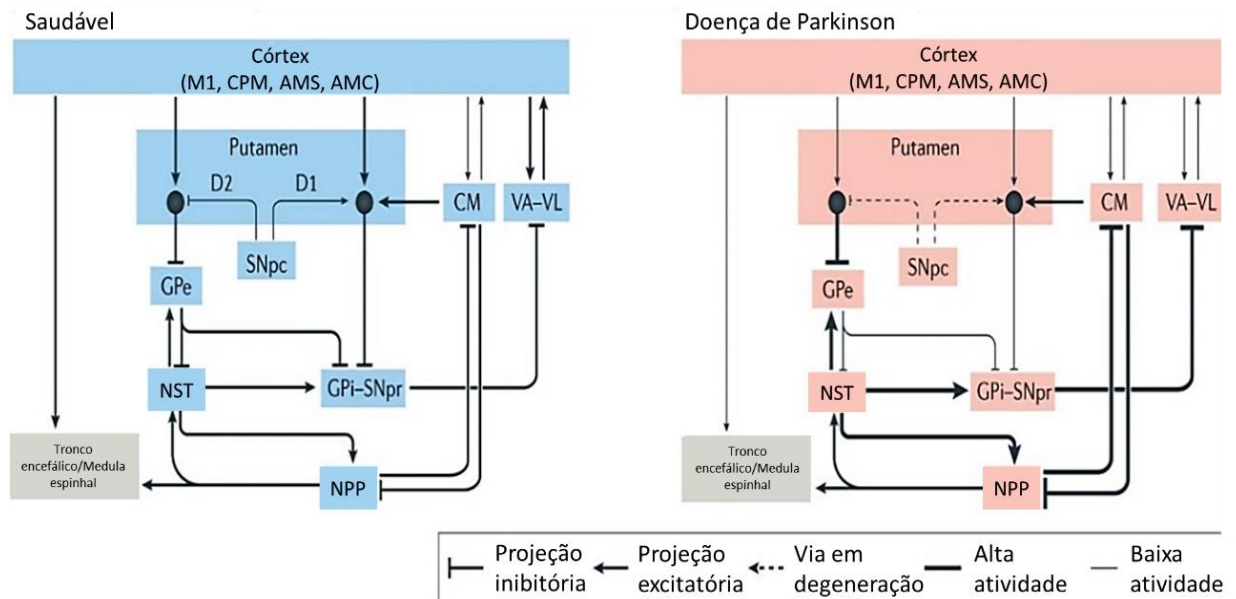
Para que ocorra a iniciação e o término do movimento voluntário é necessário que ocorra uma série de sinapses inibitórias/excitatórias nos gânglios da base e retornem ao córtex através de duas vias principais: a via direta e a via indireta. O estriado é o núcleo de influxo primário para ambas as vias, sendo composto por 95% de neurônios espinhosos médios (NEM) de projeção gabaérgica e 5% de interneurônios gabaérgicos e colinérgicos (MALLET et al., 2019). Os NEM expressam prioritariamente receptores do subtipo D1 e do subtipo D2. A ligação fisiológica da dopamina a estes receptores irá determinar a modulação das funções realizadas pelos núcleos da base. Quando os neurônios dopaminérgicos da SNpc se projetam para o estriado e atingem os NEM que expressam o receptor de dopamina D1, juntamente com a ação cortical glutamatérgica, ativam a via direta do circuito motor. Quando os neurônios dopaminérgicos emitidos pela SNpc atingem os NEM que expressam o receptor do subtipo D2, a via indireta

do circuito motor é ativada. Além disso, existem algumas regiões que dão sequência as atividades das vias mencionadas e são consideradas os núcleos de saída dos gânglios da base, como por exemplo o GPi e a SNpr. De maneira geral, a via direta é responsável pela acentuação da atividade motora, logo, uma vez que o estriado for ativado pelo córtex e pela SNpc, emitirá eferências gabaérgicas inibitórias para o GPi e a para SNpr. Devido ao fato do GPi e a SNpr apresentarem projeções inibitórias gabaérgicas tônicas que são direcionadas para os núcleos do tálamo ventral anterior (VA) e ventral lateral (VL), ocorrerá uma acentuada ativação do córtex pelas projeções excitatórias glutamatérgicas do tálamo, também tônicas. Por outro lado, a via indireta é dependente de receptores da família D2, e a ação exercida pela ativação desta via, é a diminuição da atividade neuronal nas áreas motoras do córtex cerebral. A via indireta apresenta conexões inibitórias provenientes do estriado nos segmentos do GPe. O GPe por sua vez emite projeções inibitórias para o NST e para o GPi/SNpr. O efeito da emissão dessas projeções inibitórias no NST, é o envio de projeções excitatórias de volta para o globo pálido interno “freando” o movimento através da redução da ativação do córtex motor (PRZEDBORSKI, 2017; WU; DING, 2017; MCGREGOR; NELSON, 2019).



**Figura 1** – Relação entre a complexa circuitaria formada pelo córtex, núcleos da base, tálamo, medula e as vias de neurotransmissores envolvidas. Na porção superior da figura estão representadas as áreas corticais relacionadas ao controle motor: M1 (córtex motor primário), CPM (córtex pré-motor), AMS (área motora suplementar). Na porção medial da figura são demonstrados esquematicamente os núcleos da base (putamen, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico) e as suas respectivas conexões com o córtex através do tálamo. Na porção inferior da figura estão evidenciados os motoneurônios colinérgicos da medula que irão realizar a etapa final do movimento voluntário. Adaptado de CURI; ARAÚJO FILHO, 2017.

A degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc presente na DP e a consequente perda de dopamina no estriado, levam a um comprometimento da atividade motora voluntária através da facilitação da atividade dos neurônios que dão origem à projeção indireta e a diminuição da ativação dos neurônios da via direta (Figura 2). Acredita-se primordialmente que a via direta promova a iniciação dos movimentos desejados, enquanto, a via indireta cause a inibição dos movimentos indesejados. Dessa forma o desbalanço estriatal gerado devido ao comprometimento da via direta ocasiona uma dificuldade na iniciação do movimento. Em paralelo a maior inibição do GPe, em consequência da via indireta irregular, aumenta a liberação dos neurônios tônicos do NST que estimulam o GPi a inibir fortemente os neurônios talâmicos excitatórios (nos núcleos VA e VL) que vão para o córtex, cessando o movimento existente e ocasionando os sintomas de bradicinesia da DP. Entretanto ainda existe a possibilidade de ocorrer um estado discinético, onde a debilidade do NST promove a inibição ao invés de excitação, ou seja, a menor atividade dos NST gera uma redução na saída inibitória dos gânglios basais facilitando os movimentos involuntários comumente relatados na DP. Além disso é importante ressaltar que o tronco encefálico e o cerebelo comprometidos, também são contribuintes para a instauração das disfunções motoras presentes na DP (REDGRAVE et al., 2010; PRZEDBORSKI, 2017; MANOHAR, 2020).



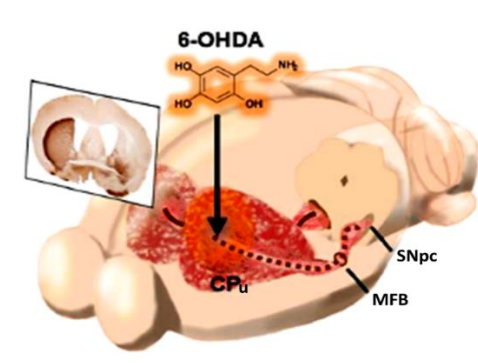
**Figura 2** – Via direta e a via indireta do circuito motor em um modelo fisiológico e na Doença de Parkinson. Legenda: globo pálido interno (GPi); globo pálido externo (GPe); núcleos subtalâmicos (NST); substância negra *pars compacta* (SNpc) e substância negra *pars reticulada* (SNpr), VA (tálamo anterior ventral), VL (tálamo lateral ventral), (CM núcleo centromedial), AMC (área motora cingulada), M1 (córtex motor primário), CPM (córtex pré-motor), NPP (núcleo pedunculopontino) AMS (área motora suplementar). Adaptado de: PRZEDBORSKI, 2017.

### 1.2.2 Modelo animal utilizado para estudar a Doença de Parkinson

Existem diferentes modelos que mimetizam a morte neuronal da DP e que estão bem caracterizados pela literatura. Dentre estes modelos podem ser mencionados a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), o lipopolissacarídeo (LPS), o paraquat e a rotenona. Os modelos de DP constituem importantes ferramentas utilizadas para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da Doença de Parkinson e podem ser reproduzidos em metodologias *in vivo* e também *in vitro*. Entretanto em alguns casos, tem-se dado preferência pela escolha do modelo *in vivo* pois a morte relativamente seletiva aos neurônios dopaminérgicos da SNpc, replica de forma significativa o quadro de DP abrangendo os amplos aspectos motores e comportamentais desta patologia (BOVÉ; PERIER, 2012; EATON; WISHART, 2017; ZENG; GENG; JIA, 2018).

Optamos por realizar no atual trabalho o modelo animal da injeção de 6-OHDA unilateral. A 6-OHDA foi a primeira neurotoxina utilizada em modelos de DP e permanece até hoje como uma das drogas mais usadas para mimetizar esta afecção neurodegenerativa, pois tem se

mostrado uma estratégia altamente eficaz em muitos estudos devido ao fato de ser um procedimento pouco complexo, de custo reduzido e de alta reprodutibilidade. Entretanto existe uma adversidade envolvida no uso desta neurotoxina em modelo animal, que é a incapacidade da 6-OHDA atravessar a barreira hematoencefálica. Para sanar este problema, é necessário que a 6-OHDA seja veiculada no organismo através da via intracerebral (IC) por meio de uma cirurgia estereotáxica. As coordenadas estereotáxicas utilizadas para reproduzir a morte neuronal dopaminérgica delimitam as regiões do estriado, do feixe do prosencéfalo medial (MFB) ou diretamente na SN. Estas regiões intraestriatais e extraestriatais quando atingidas pela 6-OHDA, apresentam diferenças principalmente na intensidade e na velocidade que os neurônios dopaminérgicos são degenerados. As lesões intraestriatais resultam em dano imediato dos terminais dopaminérgicos do núcleo estriado, seguidos de forma retrógrada, pela perda progressiva dos corpos celulares de neurônios dopaminérgicos da SNpc (Figura 3). Enquanto a administração extraestriatal de 6-OHDA nas regiões da SNpc ou do MFB, provoca a degeneração dos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos de forma rápida e violenta, envolvendo posteriormente o comprometimento da via nigroestriatal (BLANDINI; ARMENTERO, 2012; BECKER et al., 2017). Além disso, quando se trata da modulação da intensidade e do tipo de lesão, pode-se administrar a 6-OHDA em diferentes concentrações unilateral ou bilateral nos hemisférios cerebrais. No entanto para realizar o estudo das anormalidades motoras relacionadas aos déficits de dopamina no estriado, o modelo unilateral tem sido amplamente empregado em roedores (Figura 3) (TIEU, 2011; PRZEDBORSKI, 2017). Quando um agonista dopaminérgico (como a apomorfina) é administrado, este fármaco se liga nos receptores de dopamina restantes e culmina em um comportamento contralateral a lesão. E dessa maneira comprova-se que a lesão induzida promove uma alteração comportamental quantificável e correspondente a lesão proporcionada pela 6-OHDA (TIEU, 2011; HEUER et al., 2012; PRZEDBORSKI, 2017).



**Figura 3** – Sequência das regiões afetadas pela injeção unilateral de 6-OHDA intraestriatal. CPu - Caudado putamen, MFB – Feixe do prosencéfalo medial, SNpc- Substância negra *pars compacta*. Adaptado de BECKER et al., 2017.

Subsequente a padronização da região (intraestriatal/extraestriatal) e do tipo/intensidade de lesão (unilateral/bilateral/diferentes concentrações de 6-OHDA), realiza-se por fim, a administração da 6-OHDA via intracerebral. Após ser injetada no cérebro, esta neurotoxina adentra as células do sistema nervoso central por meio do mesmo sistema de transporte das catecolaminas (DAT), pois detém características estruturais análogas à dopamina. Dentro do neurônio dopaminérgico a 6-OHDA se acumula no citosol, induz toxicidade e promove a morte neuronal relativamente seletiva para neurônios dopaminérgicos da SNpc. Não está definido se a toxicidade de 6-OHDA aos neurônios dopaminérgicos está relacionada as espécies reativas produzidas a partir da auto-oxidação da 6-OHDA, a inibição dos complexos I e IV da cadeia respiratória mitocondrial, ao estresse de retículo, ao acúmulo de cálcio intracelular ou a neuroinflamação. Acredita-se, que estas alterações provocadas pela administração da 6-OHDA, podem agir individualmente ou em conjunto promovendo a morte neuronal dopaminérgica como sugerido recentemente em modelos de MPTP e rotenona (RODRIGUEZ-PALLARES et al., 2007; OH et al., 2009; BOVÉ; PERIER, 2012; WANG et al., 2017; XICOY; WIERINGA; MARTENS, 2017; BUHIDMA et al., 2020).

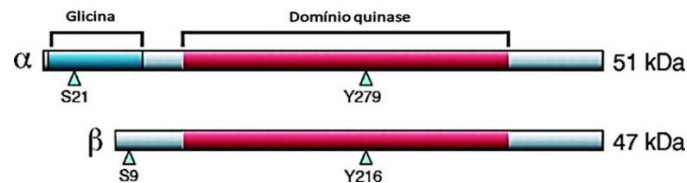
Independentemente do mecanismo inicial pelo qual ocorra a perda de neurônios dopaminérgicos nas regiões da SN (onde está inserido o corpo celular do neurônio dopaminérgico) e da diminuição de dopamina disponível no estriado (local onde esta catecolamina é liberada), a ausência ou a presença deste neurotransmissor pode mensurar o efeito da neurotoxina em questão. Sendo assim, outro método aplicado para determinar o sucesso da lesão induzida após a administração da 6-OHDA é através do monitoramento e da quantificação dos neurônios dopaminérgicos por meio da expressão da tirosina hidroxilase (TH). A TH é uma enzima presente na rota biossintética das catecolaminas e que no caso dos neurônios dopaminérgicos dá origem a dopamina. A redução da TH gerada a partir da injeção de 6-OHDA, comprova que o modelo utilizado reproduz os aspectos fisiopatológicos envolvidos na neuropatia em estudo (ZENG; GENG; JIA, 2018; ALAM; RICHARDSON, 2020; KACZYŃSKA; ANDRZEJEWSKI, 2020; WANG et al., 2021).

Ademais, o somatório dos eventos que culminam na morte neuronal induzida por alguma droga nos modelos de DP, ou na DP propriamente dita, contam com inúmeras cascatas de sinalização intracelular que estão interligadas. Assim, o estudo da interação de algumas vias de morte neuronal, pode melhor elucidar a afecção neurodegenerativa em questão.

### 1.3 A enzima GSK-3 $\beta$

Dentre as vias de sinalização que estão relacionadas com a morte neuronal dopaminérgica, pode ser mencionada a via da enzima Glicogênio Sintase Quinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ). A GSK-3 $\beta$  é derivada da Glicogênio Sintase Quinase-3 (GSK-3), cuja a qual é uma enzima ubíqua no organismo dos mamíferos e que apresenta duas classes de cDNA descritas a partir do isolamento em cérebro de rato: a Glicogênio Sintase Quinase-3 $\alpha$  (GSK-3 $\alpha$ ) (banco de proteínas número de acesso: NP\_063937.2) e a GSK-3 $\beta$  (banco de proteínas número de acesso: NP\_001139628.1 e NP\_002084.2) (WOODGETT, 1990). Ambas as isoformas da enzima GSK-3, apresentam 11 éxons e 98% de similaridade na região dos seus domínios catalíticos indicando a presença de várias funções sobreponíveis (PATEL; WOODGETT, 2017). Entretanto apesar desta semelhança existem algumas peculiaridades que distinguem a GSK-3 $\alpha$  da GSK-3 $\beta$ , como por exemplo, a codificação das enzimas ser realizada em cromossomos distintos. A enzima GSK-3 $\alpha$  é codificada no cromossomo 7 em camundongo (cromossomo 19 em humano) e a enzima GSK-3 $\beta$  é codificada no cromossomo 16 em camundongo (cromossomo 3 em humano) (YAO et al., 2002). Outro importante contraste existente entre as enzimas GSK-3 $\alpha$  e a GSK-3 $\beta$  está no peso molecular (PM). A GSK-3 $\alpha$  possui um PM de 51 kDa e a GSK-3 $\beta$  tem um PM de 47 kDa (DOBLE; WOODGETT, 2003). Esta variação é dada pela adição de 63 aminoácidos no resíduo amino terminal da GSK-3 $\alpha$ , característica de uma extensão que contém elevada quantidade de glicina e que proporciona a formação de “caudas” moleculares distintas (Figura 4). Além disso, a GSK-3 $\alpha$  e a GSK-3 $\beta$  diferem na região carboxi-terminal, compartilhando apenas 34% de similaridade nesta região devido a variação nos últimos 80 resíduos de aminoácidos. Estas discrepâncias proporcionam a geração de PM diferentes que garantem apenas 85% de homologia entre as isoformas da GSK-3 e são responsáveis por promover a variável interação destas enzimas com os seus substratos (JACOBS et al., 2012). Para comprovar este feito, foram realizadas deleções dos genes GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  em camundongos e demonstrou-se que a deleção de GSK-3 $\beta$  é letal para estes animais, em compensação os camundongos que não expressaram a GSK-3 $\alpha$  eram viáveis e relativamente normais (YAO et al., 2002; LI et al.,

2014a). Assim, foi constatado que as isoformas da enzima GSK-3 poderiam exercer funções distintas dependentes da região em que estão localizadas e não se sobrepõem obrigatoriamente. Em vista do que foi descrito, as enzimas GSK-3 $\alpha$  e a GSK-3 $\beta$  foram consideradas quinases não idênticas estruturalmente e funcionalmente (PANDEY; DEGRADO, 2016).



**Figura 4** – Representação esquemática das isoformas da GSK-3: a enzima GSK-3 $\alpha$  e a enzima GSK-3 $\beta$ . Nesta figura está enfatizada a homologia do domínio quinase (catalítico) das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  da GSK-3. Em contrapartida está sendo demonstrado que os diferentes pesos moleculares são obtidos a partir da presença de caudas moleculares distintas entre as isoformas da enzima GSK-3. Adaptado DOBLE; WOODGETT, 2003.

Apesar disso, tanto a GSK-3 $\alpha$  quanto a GSK-3 $\beta$  estão implicadas nas funções cerebrais devido à alta expressão de ambas as enzimas nas regiões do hipocampo, córtex cerebral e células de Purkinje (cerebelo). Entretanto o estudo GSK-3 $\beta$  passou a despertar grande relevância científica devido a esta quinase ter sido considerada uma enzima essencial na regulação dos eventos precoces do desenvolvimento neuronal e atuar como um componente crítico nas etapas de neurogênese, de migração neuronal, de diferenciação celular e principalmente de apoptose neuronal. Todavia no caso da enzima GSK-3 $\alpha$ , o mesmo efeito imprescindível varia entre as estruturas e funções a serem exercidas (YAO et al., 2002; SOUTAR et al., 2010; KIM; SNIDER, 2011; BARRELL; SZABO-ROGERS; LIU, 2012; MAURER et al., 2014). Portanto devido a GSK-3 $\beta$  realizar uma ampla gama de funções que contribuem com a manutenção da homeostase cerebral, tem-se correlacionado o desbalanço da expressão da GSK-3 $\beta$  nos neurônios e em células da glia com várias doenças que atingem o SNC como a DP (LI et al., 2020), a depressão maior (INKSTER et al., 2018), o Alzheimer (LLORENS-MARÃ-TIN et al., 2014), o transtorno bipolar (JACOBY et al., 2016) e a lesão cerebral induzida por hipóxia isquêmica (HUANG et al., 2017).

Estes estudos apesar de esclarecedores em relação ao papel das isoformas da enzima GSK-3 no SNC, também chamaram a atenção para a atividade bifuncional da GSK-3 $\beta$ . A GSK-3 $\beta$  pode atuar na promoção de sobrevivência neuronal (envolvida principalmente na extensão dos dendritos e na formação de sinapses), bem como, contribuir direta e indiretamente com a



sinalização de apoptose na célula. A escolha da via de sobrevivência/morte celular a ser seguida, é dependente da organela em questão e das condições fisiopatológicas em que a célula se encontra (BEUREL; JOPE, 2006; JACOBS et al., 2012).

Um exemplo disso está na localização preferencial da GSK-3 $\beta$  ser predominantemente no citosol, onde pode interagir com muitos substratos e aparenta contribuir com os sinais de sobrevivência celular. Contudo, após o tratamento com compostos que estimulam a apoptose como a camptotecina ou a taspigargina, observou-se que a sua conformação ativa aumentou em torno de 5 a 8 vezes nas regiões nucleares e mitocondriais quando comparadas ao citosol, pois o núcleo e as mitocôndrias são importantes organelas sinalizadoras dos estímulos apoptóticos (BIJUR; JOPE, 2003; GOLPICH et al., 2015; BAUTISTA et al., 2018). A enzima GSK-3 $\beta$  promove a sinalização da apoptose através da inibição de fatores de transcrição pró-sobrevivência celular (CREB e o fator de choque térmico-1) e facilita a ativação de fatores de transcrição pró-apoptóticos (p53, p65) (JACOBS et al., 2012). Sendo assim, a conformação ativa da enzima GSK-3 $\beta$  tem sido amplamente correlacionada com a morte neuronal na DP (GU et al., 2017; YANG et al., 2017) à medida que é encontrada significativamente aumentada em estruturas que estão relacionadas com a neurodegeneração, como por exemplo o retículo endoplasmático (STOICA et al., 2016), os lisossomos (REN et al., 2018) e os corpos de Lewy (CREDLE et al., 2015).

### *1.3.1 A regulação da atividade da enzima GSK-3 $\beta$ por proteínas quinases*

A atividade enzimática da GSK-3 $\beta$  é um processo complexo e que apresenta inúmeros mecanismos envolvidos. Krishnankutty e colaboradores demonstraram existir três fosfoisotipos de GSK-3 $\beta$  responsáveis por modular prioritariamente a atividade multifuncional e determinar o destino da célula em cérebros de camundongos: a GSK-3 $\beta$  fosforilada em Serina 9 [GSK-3 $\beta$  (S9)] e em Tirosina 216 (Y216), a GSK-3 $\beta$  fosforilada apenas em Y216 [GSK-3 $\beta$  (Y216)] e a GSK-3 $\beta$  não fosforilada (KRISHNANKUTTY et al., 2017). Em suma, quando a GSK-3 $\beta$  encontra-se fosforilada em Y216, a sua atividade catalítica aumenta cerca de 200 vezes (TER HAAR et al., 2001) e quando a GSK-3 $\beta$  apresenta-se fosforilada em S9 a sua atividade enzimática torna-se suprimida (PANDEY; DEGRADO, 2016). Constitutivamente logo após a tradução, grande parte da GSK-3 $\beta$  que foi produzida é ativada por meio de auto fosforilação na região do domínio central no loop de ativação que envolve os resíduos de Y216. Este processo

acontece durante o enovelamento de proteínas e tem sido demonstrado dependente de HSP90 (COLE; FRAME; COHEN, 2004; LOCHHEAD et al., 2006; KRISHNANKUTTY et al., 2017). Dessa forma, o principal mecanismo regulador da atividade da enzima GSK-3 $\beta$  ocorre por meio da fosforilação inibitória, classificando-a como uma quinase atípica. A modulação inibitória é o método melhor elucidado e que apresenta uma maior relevância para execução das funções exercidas pela GSK-3 $\beta$  (BEUREL; GRIECO; JOPE, 2015; GOLPICH et al., 2015; PATEL; WOODGETT, 2017; YANG et al., 2017). A fosforilação inibitória promove o dobramento da quinase em seu próprio bolso de ligação como se fosse um substrato e impede assim, a entrada de um substrato legítimo no sulco de ligação da GSK-3 $\beta$  (PATEL; WOODGETT, 2017). Este tipo de modulação negativa da atividade da GSK-3 $\beta$  costuma ser normalmente efetuada por proteína Quinase A (PKA) (XIE et al., 2016), por proteína Quinase B (AKT) (NAIR; OLANOW, 2008) e por proteína Quinase C (PKC) (YUAN et al., 2010). Contudo a via da AKT aparenta ser a principal via envolvida na fosforilação inibitória da GSK-3 $\beta$ .

### *1.3.2 Função serina/treonina quinase da enzima GSK-3 $\beta$ nos substratos Tau e $\alpha$ -Syn*

Após ser encontrada fosforilada em GSK-3 $\beta$  (Y216), a enzima GSK-3 $\beta$  torna-se capaz de transferir um grupamento fosfato do trifosfato de adenosina (ATP), para o radical hidroxila de uma cadeia lateral dos aminoácidos serina ou treonina de seus substratos. Logo, a fosforilação em Y216, converte a molécula de a GSK-3 $\beta$  em uma serina/treonina quinase madura (LOCHHEAD et al., 2006). A alta expressão de GSK-3 $\beta$  (Y216) no tecido neural tem se destacado cada vez mais pelo seu envolvimento na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, onde atua por meio da fosforilação de alguns substratos que desempenham papéis relacionados com a regulação positiva da expressão de genes e da fosforilação de proteínas envolvidas com a neuroinflamação e a neurodegeneração (YAO et al., 2002; LI et al., 2014a). Além disso, a conformação ativa da GSK-3 $\beta$  (Y216) contribui direta e indiretamente com a via de morte neuronal na DP através da fosforilação de alguns substratos (GU et al., 2017; YANG et al., 2017). Dentre os ligantes da GSK-3 $\beta$  que foram relatados como influentes na morte dopaminérgica na SN podem ser mencionados a  $\alpha$ -Sinucleína ( $\alpha$ -Syn) e a proteína Tau.

A  $\alpha$ -Syn é encontrada no núcleo, nas mitocôndrias e nos terminais pré-sinápticos dos neurônios dopaminérgicos da SNpc. Esta proteína controla a dinâmica das vesículas liberadoras

e o tráfego de neurotransmissores através da formação do complexo SNARE. Relatos na literatura validam a existência de altos níveis de  $\alpha$ -Syn fosforilada no cérebro post-mortem de pacientes com DP (SWIRSKI et al., 2014). A possível justificativa para este fato está na capacidade da  $\alpha$ -Syn sofrer modificações pós-traducionais em circunstâncias patológicas que alteram a sua conformação nativa, gerando oligômeros prejudiciais aos neurônios em que se encontram. A  $\alpha$ -Syn disfuncional tende a se agregar e se depositar em algumas organelas. Dessa forma, estes depósitos fibrilares de  $\alpha$ -Syn são descritos como possíveis bases da neurodegeneração e constituem as estruturas denominadas de corpos de Lewy (LBs) (MAHUL-MELLIER et al., 2020). Estas inclusões citoplasmáticas surgem na SNpc e são encontradas tanto nas formas esporádicas quanto genéticas da DP, sendo seguidas pela neurodegeneração retrógrada, gliose reativa e por fim, a morte neuronal (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002). A presença da enzima GSK-3 $\beta$  nos LBs (NAGAO; HAYASHI, 2009) foi uma observação que fundamentou a influência da GSK-3 $\beta$  na patogênese da DP. Assim, muitos estudos procuram compreender como se é dada esta correlação. Logo, foi verificado que a superexpressão da  $\alpha$ -Syn compactua com a redução da fosforilação GSK-3 $\beta$  (S9), mas não influencia a quantidade de proteína GSK-3 $\beta$  total (YUAN et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que a enzima GSK-3 $\beta$  (Y216), transfere um grupo fosfato para a  $\alpha$ -Syn na posição S129 nos neurônios TH<sup>+</sup> da SN (CREDLE et al., 2015). E a ação direta da enzima GSK-3 $\beta$  potencializa a formação da  $\alpha$ -Syn anômala, comprometendo assim, as funções homeostáticas da  $\alpha$ -Syn que enaltecem o estresse oxidativo nigral.

Assim como a  $\alpha$ -Syn, o depósito da proteína Tau está relacionado com a DP. A Tau humana é pertencente à família das proteínas associadas aos microtúbulos (microtubule-associated proteins-MAP) (WEINGARTEN et al., 1975) e em nível fisiológico é encontrada no cérebro adulto na forma solúvel monomérica (SPILLANTINI; GOEDERT, 2013), apresentando seis isoformas derivadas do splicing alternativo de RNAm (PARK; AHN; GALLO, 2016). Em relação as principais funções da proteína Tau, podem ser mencionadas a manutenção da estabilidade dos microtúbulos por meio da agregação a tubulina e o apoio ao transporte axonal (DRUBIN; KIRSCHNER, 1986; HERVY; BICOUT, 2019; FUNG et al., 2020). Além disso, a Tau pode interagir com a proteína precursora amilóide (APP) e orquestrar a exportação do íon ferro II (Fe<sup>2+</sup>) (AYTON et al., 2015) do interior do neurônio dopaminérgico por meio da ferroportina (STANKOWSKI; DAWSON; DAWSON, 2012). Desta forma, existem resultados indicativos de que a redução da taxa de Tau solúvel em amostras de SN post mortem de pessoas afetadas pela DP, promoveu a retenção do íon ferro e induziu a degeneração dopaminérgica

quando comparadas aos grupos controles (LEI et al., 2012). Os mecanismos fisiopatológicos que regulam a atividade da Tau ocorrem por meio das modificações pós-traducionais. Nos processos patológicos, o equilíbrio fosforilação/desfosforilação é deslocado para o sentido da fosforilação e a partir disso tem-se a formação dos emaranhados neurofibrilares que estão presentes nas taupatias (NOBLE et al., 2005). A hiperfosforilação da Tau deprime a atividade biológica desta proteína, estando relacionada com a DP e a outras patologias neurodegenerativas (BRUNELLO et al., 2020). A Tau é um substrato da GSK-3 $\beta$  e a sua hiperfosforilação nos neurônios dopaminérgicos está envolvida com a DP. Em um trabalho onde foram veiculados lipossomas contendo fator básico de crescimento de fibroblastos (bFGF), foi obtido o efeito neuroprotetor nos neurônios TH<sup>+</sup> da SN por meio de redução da fosforilação da Tau e da GSK-3 $\beta$ , além do aumento simultâneo da fosforilação da via de PI3K/AKT em modelo *in vitro* de 6-OHDA (YANG et al., 2016). Da mesma forma, a queda na taxa de fosforilação de AKT (Treonina 308) e de GSK-3 $\beta$  (S9), ocasionados por mutações relacionadas a DP no gene DJ-1, elevaram a fosforilação da Tau disfuncional. No entanto, após a administração do cloreto de lítio (LiCl) obteve-se a reversão deste processo por meio de uma redução na fosforilação da Tau nas células transfectadas com DJ-1 L166P (WANG et al., 2013). Portanto o uso do LiCl tem se tornado uma importante estratégia moduladora da enzima GSK-3 $\beta$ .

#### **1.4 Mecanismos modulatórios do lítio na atividade da enzima GSK-3 $\beta$**

O lítio é um cátion monovalente que foi utilizado por John Cade pela primeira vez no ano de 1949, na forma de carbonato de lítio para tratar a mania (CADE, 1999). No entanto este fármaco foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como um medicamento estabilizador do humor, apenas no ano de 1970 (GAJWANI et al., 2006). Após este período surgiu uma nova era onde o lítio passou a ser empregado tradicionalmente como “padrão ouro” para o tratamento do transtorno bipolar (TB) (PUGLISI-ALLEGRA; RUGGIERI; FORNAI, 2021) e que se estende até os dias de hoje, especialmente no uso profilático à longo prazo (TONDO et al., 2019). Além disso, o uso do lítio tem sido efetivo em episódios de mania e também demonstrou-se benéfico para o funcionamento neurocognitivo em pacientes com TB (PAPADIMA et al., 2017; BURDICK et al., 2020; VOLKMANN; BSCHOR; KÖHLER, 2020). Porém, com o passar dos anos, foram lançados novos trabalhos *in vitro* e *in vivo* que apresentaram resultados indicativos de que o lítio é um agente modulador de muitas cascatas celular e os seus mecanismos de sinalização vão além da estabilização do humor, como por

exemplo: auxiliar na diferenciação de células-tronco neurais, aumentar a taxa de regeneração neuronal (QI et al., 2017), aliviar as lesões geradas na barreira hematoencefálica após a hemorragia intracerebral em ratos (LI et al., 2018), reduzir a expressão de fatores inflamatórios, ser protetor contra a neurodegeneração (GREENWOOD et al., 2018; TORICELLI et al., 2020), atuar em mecanismos redutores do estresse oxidativo (consequentemente da neuroinflamação), estimular a autofagia em um modelo de rotenona, inibir a apoptose neuronal e reduzir o acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína nos neurônios dopaminérgicos (MOTOI et al., 2014; HOU et al., 2015; LAZZARA; KIM, 2015). Sendo assim, as evidências recentes passaram a instigar os pesquisadores a desbravar o potencial uso do tratamento com o lítio nas doenças neurodegenerativas, e dentre estas patologias, tem-se destacado a DP.

Embora existam muitos alvos que são influenciados pelos mecanismos moduladores do lítio, ainda não está claro quais destes substratos são responsáveis pela eficácia neuroprotetora exercida por este cátion monovalente (LAZZARA; KIM, 2015). Contudo tem-se importantes respaldos de que os principais mecanismos que estão envolvidos na atividade neuroprotetora do lítio apresentam uma forte correlação com a atividade da enzima GSK-3 (em especial da GSK-3 $\beta$ ) e atuam por meio da inibição desta enzima em frentes diretas e indiretas. De maneira direta, o lítio inibe a enzima GSK-3 $\beta$  por meio de uma competição com o íon magnésio ( $Mg^{2+}$ ), deslocando o  $Mg^{2+}$  de seus locais de ligação. Este deslocamento do  $Mg^{2+}$  reduz a estabilidade e a funcionalidade da enzima GSK-3 $\beta$ . E por fim, o outro mecanismo inibitório exercido pelo lítio na enzima GSK-3 $\beta$  acontece indiretamente através do estímulo de algumas quinases que são responsáveis por promover o aumento da fosforilação inibitória em GSK-3 $\beta$  (S9). Esta fosforilação em serina 9 é realizada principalmente pela AKT e influencia a atividade enzimática da GSK-3 $\beta$  (DE SARNO; LI; JOPE, 2002; BEAULIEU et al., 2004; PAN et al., 2011; ZENG et al., 2016; MONACO; FERGUSON; GAO, 2018). Ao inibir a expressão desta quinase, tem-se como consequência uma proteção em relação ao seu potencial pró-apoptótico. Martin e colaboradores visualizaram que a inibição de GSK-3 $\beta$  realizada pelo lítio promoveu a redução da formação de pTau (MARTIN et al., 2009). Semelhante ao que foi visto por Duka e colaboradores, onde o lítio exerceu uma atividade protetora em um modelo de DP por administração de  $MPP^+$ , prevenindo a morte das células SH-SY5Y e a formação de pGSK-3 $\beta$ , além de diminuir o acúmulo de  $\alpha$ -Syn e a formação de pTau (WILLS et al., 2010).

Apesar do efeito neuroprotetor do lítio apresentar grande destaque na literatura, existem achados antagônicos em relação ao tratamento com este composto. Em 1949, ano no qual o lítio

foi utilizado como tratamento para TB pela primeira vez, surgiram vários casos de intoxicação aguda grave que estavam associados aos sais de lítio terem sido utilizados erroneamente no lugar do sal de cozinha. Estes relatos chamaram atenção dos estudiosos para o potencial tóxico deste fármaco em margens estreitas (CADE, 1999). Hlaing e colaboradores relataram que o uso do lítio induziu a neurotoxicidade após a veiculação prolongada deste composto (HLAING et al., 2020). Estando em consenso com o que foi visto Hay e Simpson, onde o lítio exerceu a toxicidade mesmo em concentrações séricas terapêuticas (HAY; SIMPSON, 1982), podendo desenvolver demência progressiva com sinais cerebrais multifocais (FARINA et al., 2017).

Para entender melhor o efeito neuroprotetor ou neurotóxico do tratamento com lítio, é importante conhecer as propriedades farmacocinéticas deste fármaco. O lítio é absorvido rapidamente pelo organismo (WARE; TILLERY; LINDER, 2016), apresentando uma biodisponibilidade de 80-100% e o seu tempo de meia-vida varia de 18-36 horas. A depuração total do lítio acontece em torno de 10-40 mL por minuto, sendo predominantemente excretado pelos rins na forma de íon livre. Neste aspecto, quando se sugere o uso do lítio como possível estratégia para a DP, é importante levar em consideração que a população idosa é prioritariamente afetada por esta patologia neurodegenerativa e nestes indivíduos, a depuração do lítio se encontra reduzida por aspectos intrínsecos ao envelhecimento. Dessa forma o lítio pode ficar circulante por mais tempo e aumentar a chance de induzir toxicidade. Além disso, tem-se observado que em casos de insuficiência renal, ocorre a redução na taxa de depuração do lítio elevando assim, a possibilidade de intoxicação por este composto. Neste caso em específico, o tratamento com o lítio é contraindicado (GRANDJEAN; AUBRY, 2009).

Devido à dose letal do lítio ser próxima da dose terapêutica, procura-se monitorar a atividade deste composto dosando a sua concentração sérica. A margem terapêutica do lítio tem sido considerada de 0,5-1,5 mmol (HEDYA; AVULA; SWOBODA, 2021). Porém a para que ocorra a inibição da GSK-3 $\beta$ , é necessário que o LiCl apresente a concentração sérica entre 1-2 mmol (LAZZARA; KIM, 2015). Esta estreita margem terapêutica que torna LiCl capaz de inibir a GSK-3 $\beta$  e ao mesmo tempo não promove a toxicidade celular, tem sido o maior desafio do uso deste fármaco para o tratamento de doenças que envolvem a atividade da GSK-3 $\beta$ . Este cuidado é redobrado principalmente nas neurodegenerativas, à medida que estas enfermidades afetam na maior parte dos casos, a população idosa, cuja a qual, apresenta o cérebro como um microambiente redox propício a neurodegeneração e uma redução na atividade dos sistemas antioxidantes característicos do envelhecimento (GRANDJEAN; AUBRY, 2009; MAYNARD

et al., 2015). Além do mais, quando se considera o uso do lítio como uma estratégia terapêutica para a DP é importante considerar que o SNC é o principal local de toxicidade exercida por este composto e as manifestações clínicas incluem confusão, ataxia, convulsões e principalmente sintomas de natureza extrapiramidal, como de temores que podem acontecer desde concentrações terapêuticas de lítio até em casos de superdosagens (JOHNELS; WALLIN; WALINDER, 1976; DONALDSON; CUNINGHAM, 1983; BAIRD-GUNNING et al., 2017; TONDO et al., 2019). Outras manifestações clínicas que podem ser geradas pela toxicidade do lítio no organismo são: a disfunção renal, os distúrbios gastrointestinais, as alterações cardíacas e as disfunções endócrinas (VALLÉE; VALLÉE; LECARPENTIER, 2021). Logo, a intoxicação induzida pelo tratamento com este fármaco tem se tornado um problema clínico comum (HAUSSMANN et al., 2015). Portanto apesar de ser altamente eficaz no tratamento de muitas doenças, o uso do lítio foi reduzido nos últimos anos devido à necessidade de monitorar as concentrações séricas, com o intuito de reduzir os efeitos adversos do tratamento (PUGLISI-ALLEGRA; RUGGIERI; FORNAI, 2021).

Em vista do que foi mencionado, a terapêutica do lítio para a DP deve ser melhor elucidada pois, mesmo que este fármaco tenha se demonstrado neuroprotetor em muitos casos, ele ainda apresenta um papel dual *in vivo e in vitro* na morte neuronal. Yousefsani e colaboradores observaram que o lítio é um composto neurotóxico de maneira dose-dependente e esta neurotoxicidade é gerada por aumento das espécies reativas de oxigênio e a promoção da lipoperoxidação. Este ambiente redox ocasiona o desbalanço na atividade das mitocôndrias e de suas respectivas conexões com o retículo endoplasmático. E de maneira complementar, os neurônios incubados apenas com o lítio tiveram uma rápida depleção de enzimas pertencentes ao sistema antioxidante endógeno (YOUSEFSANI; ASKIAN; POURAHMAD, 2020). Outros estudos detectaram que o potencial deletério do uso do lítio crônico pode atingir a SN, promovendo a redução de células TH<sup>+</sup> na SN e o aumento na taxa de ferro nigral, mesmo em doses terapêuticas (DONALDSON; CUNINGHAM, 1983; LEI et al., 2017). Conectando-se dessa forma com os relatos de casos recentes que demonstraram que o lítio a longo prazo está relacionado com uma maior incidência do uso de drogas antiparkinsonianas ou até mesmo com aumento dos diagnósticos de DP (MARRAS et al., 2016) devido ao efeito cumulativo deste fármaco (HEDYA; AVULA; SWOBODA, 2021). Estes trabalhos em conjunto desafiam o uso do lítio como o tratamento da DP e validam a necessidade de mais estudos que avaliem os mecanismos pelos quais o lítio promove a neuroproteção/neurotoxicidade na SN.

## **2 OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do tratamento com LiCl intraperitoneal nos neurônios dopaminérgicos da SN e do núcleo estriado de camundongos C57BL/6J, bem como investigar a influência do LiCl na expressão das enzimas TH, GSK-3 $\beta$ , AKT e da sinalizadora de apoptose Caspase-3, nas mesmas regiões mencionadas, em um modelo de DP induzido pela administração da neurotoxina 6-OHDA.



### 3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A DP é uma doença crônica e progressiva de etiologia multifatorial que afeta 1% dos indivíduos acima de 60 anos e 4% dos indivíduos acima de 80 (PRINGSHEIM et al., 2014; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Levando em consideração o aumento da expectativa de vida da população mundial, a DP é uma importante afecção neurodegenerativa a ser estudada, além disso a DP esta patologia foi considerada o distúrbio neurológico que teve o crescimento mais rápido em todo o mundo (DE LAU; BRETELER, 2006; FEIGIN et al., 2017).

Apesar dos avanços na terapêutica da DP, os atuais tratamentos disponíveis promovem significativos efeitos adversos, são pouco eficazes quando há presença de sintomas resistentes à levodopa e não interferem no processo degenerativo subjacente (ELKOUZI et al., 2019). Com o intuito de poupar gastos futuros em terapias limitadas, surge uma incansável busca em torno de alternativas inovadoras que envolvam a neuroproteção na DP. Em vista disso, o presente trabalho se demonstra altamente relevante, pois propôs estudar o efeito do cloreto de lítio (LiCl), fármaco o qual, tem sido cotado como uma possível estratégia terapêutica para a DP (QI et al., 2017; TORICELLI et al., 2020).

Existem poucos estudos que avaliaram o efeito do lítio em neurônios dopaminérgicos da SN e de suas projeções estriatais. Aqui nós propomos quantificar através da expressão de TH e desmembrar assim a linha tênue entre os efeitos neuroprotetores/neurotóxicos do LiCl na SN. Além disso, estudamos a interação do LiCl e da enzima GSK-3 $\beta$ , nas vias sinalizadoras de morte dos neurônios dopaminérgicos, através de um modelo de DP induzido pela 6-OHDA. Os achados encontrados por nós podem contribuir com o direcionamento da viabilidade do LiCl para o tratamento da DP.

## 4 METODOLOGIA

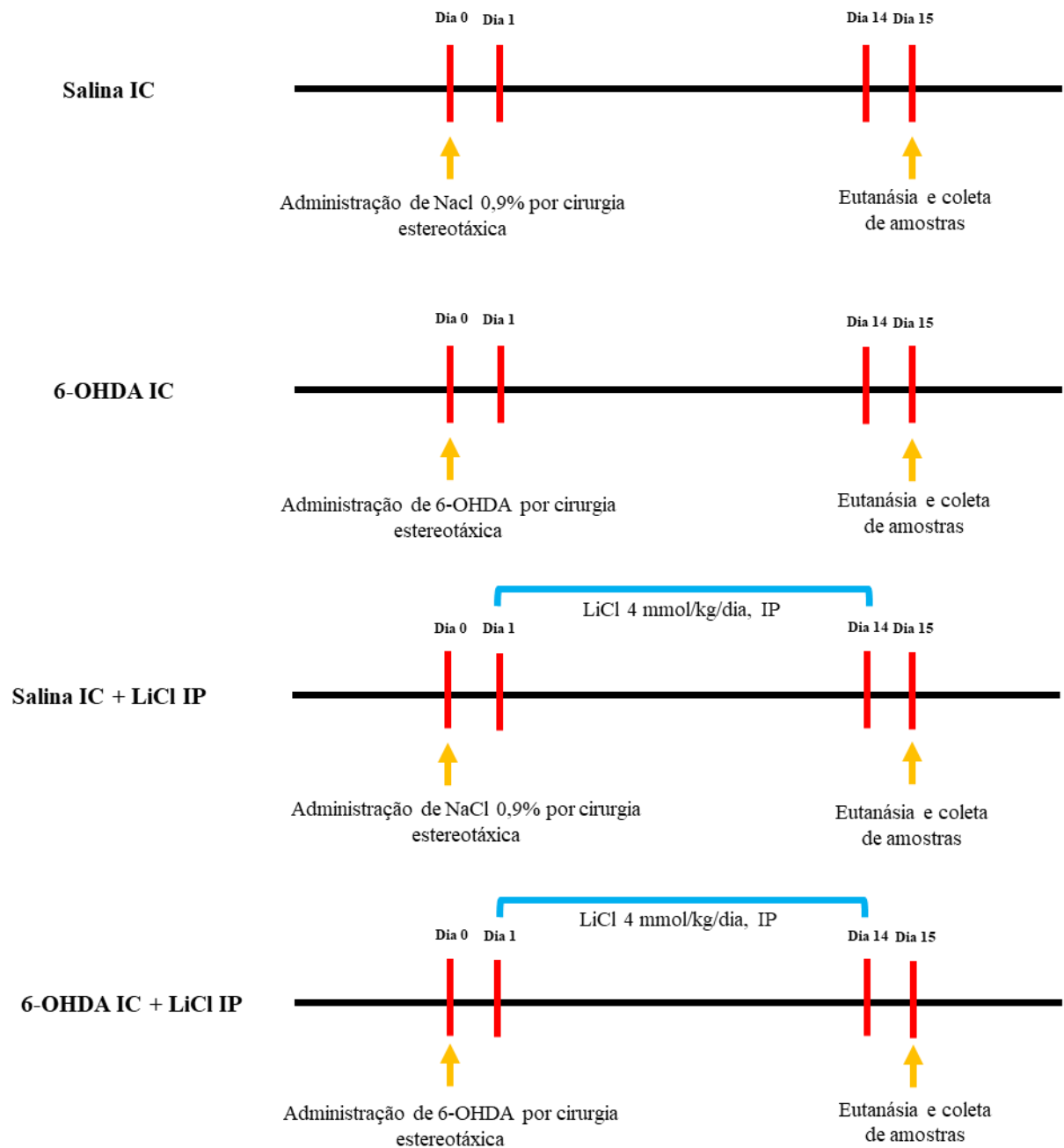
### 4.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6J machos adultos de 12 semanas de idade pesando de 25 a 30g, provenientes da matriz de camundongos do biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, do Instituto de Ciências Biomédicas, na Universidade de São Paulo e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada (23°C), ciclo claro/escuro de 12 horas, alimentados com ração industrial e água *ad libitum*. Os procedimentos apresentados foram encaminhados à Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP) e o protocolo aprovado foi registrado sob o nº 7708010318.

### 4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos randomizadamente conforme mostrado na Figura 5, nos seguintes grupos experimentais (n=4/5 por metodologia):

- 1- **Grupo Salina IC:** 2 µl de NaCl 0,9% + ácido ascórbico 0,2% injetada unilateralmente na região direita do estriado intracerebral (IC).
- 2- **Grupo 6-OHDA IC:** 2 µl de 6-OHDA a 2 µg/µL, dissolvida em solução de NaCl 0,9% + ácido ascórbico 0,2%, injetada unilateralmente na região direita do estriado (IC).
- 3- **Grupo Salina IC + LiCl:** 2 µl de NaCl 0,9% + ácido ascórbico 0,2%, injetada unilateralmente na região direita do estriado (IC). Tratamento com LiCl 4 mmol/kg por 14 dias intraperitoneal (IP).
- 4- **Grupo 6-OHDA IC + LiCl:** 2 µl de 6-OHDA a 2 µg/µL, dissolvida em solução de NaCl 0,9% + ácido ascórbico 0,2%, injetada unilateralmente na região direita do estriado (IC). Tratamento com LiCl 4 mmol/kg por 14 dias (IP).



**Figura 5** – Desenho experimental da análise do processo neurodegenerativo e do tratamento com o LiCl em camundongos C57BL/6. As amostras foram coletadas no 15º dia e direcionadas às metodologias de imuno-histoquímica, RT-PCR e imunoblotting.

#### 4.4 Indução do modelo de Doença de Parkinson por meio da administração de 6-OHDA

Os camundongos C57BL/6 foram previamente anestesiados com isoflurano a 6% e mantidos com isoflurano a 4%. Posteriormente, foram posicionados em um aparelho estereotáxico, por meio de hastes específicas para camundongos (KOPF 922). Para mimetizar a morte dopaminérgica característica da DP, utilizou-se a 6-OHDA (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), injetada diretamente no CPu devido ao fato dessa substância não conseguir atravessar a barreira hematoencefálica. A injeção da 6-OHDA em coordenadas intraestriatais no encéfalo do animal, desencadeia uma lesão retrógrada nos neurônios da substância negra e do estriado. Esta neurotoxina, foi administrada unilateralmente do lado direito do estriado, por meio de uma microseringa Hamilton® (modelo #75). A concentração da 6-OHDA era de 2 µg/µl, dissolvida em uma solução de NaCl 0,9% apresentando o ácido ascórbico 0,2% como antioxidante. Veiculou-se apenas NaCl 0,9% + ácido ascórbico 0,2% ou 6-OHDA (2 µg/µL) dissolvida em solução de NaCl 0,9% + ácido ascórbico 0,2%, de acordo com o respectivo grupo, em dois pontos distintos (1µl/ponto) nas seguintes coordenadas estereotáxicas: Ponto 1: A (anterior): +1.0 mm; ML (médio-lateral): 2,0 mm em relação ao bregma e DV (dorsoventral): 3 mm em relação a dura-máter. Ponto 2: P (posterior): - 0,3 mm; ML: 2,3 mm em relação ao bregma e DV: 3 mm em relação a dura-máter. O volume total injetado da droga, foi de 2 µl e a concentração final injetada no encéfalo do animal foi de 4µg de 6-OHDA. Cada microlitro foi injetado lentamente, durante um período de 5 minutos em cada ponto. A agulha permaneceu no local por mais 5 minutos antes de ser removida. Após esse intervalo, a seringa Hamilton foi retirada com cuidado e vagorosamente por 5 minutos. O grupo salina recebeu apenas 1 µl do veículo (NaCl 0,9% contendo ácido ascórbico 0,2%) em cada um dos pontos, nas mesmas coordenadas estereotáxicas. Os animais foram eutanasiados 15 dias após o procedimento cirúrgico e os materiais foram coletados para as análises posteriores propostas no projeto (RT-PCR, IMUNOBLOTTING e IMUNO-HISTOQUÍMICA) (CHEN et al., 2017a)

#### **4.5 Tratamento com o cloreto de lítio intraperitoneal**

O tratamento com o LiCl foi realizado intraperitoneal na concentração de 4 mmol/kg (170mg/kg) por 13 dias. Relatos na literatura demonstram em modelos de camundongos que a concentração de 4 mmol/kg em uma única dose, é capaz de inibir a enzima GSK3-β (YUSKAITIS et al., 2010).

#### **4.6 Imuno-histoquímica**

Os animais (n=5 por grupo) tratados foram previamente anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (26 mg/kg) e submetidos a perfusão transcardíaca através da administração de uma solução de NaCl 0,9% durante 10 minutos, seguida da solução fixadora constituída de paraformaldeído (PFA) 4% dissolvido em tampão fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4), durante 5 minutos. Logo após esta etapa, o encéfalo foi coletado e fixado por um período de 4 horas em uma solução contendo PFA 4% dissolvido em PB 0,1 M. Depois desse período, o tecido foi imerso em solução citoprotetora de sacarose na concentração de 30% e mantido por 48 horas. Em seguida, os cérebros foram seccionados no micrótomo de congelamento com espessura de 30µm e imersos em solução de NaCl 0,9% para o uso nas metodologias de imuno-histoquímica pelo método da peroxidase e imuno-histoquímica de fluorescência.

Para a imuno-histoquímica pelo método da peroxidase, as secções foram incubadas por 24 h *free-floating* com o anticorpo primário tirosina hidroxilase (1:1000; Chemicon, Temecula, CA, EUA), diluído em uma solução de PB 0,2 M contendo Triton X-100 0,3% e soro de cabra a 5% (Jackson ImmunoResearch, PA, EUA). Após 24 horas, os cortes foram lavados por três vezes de 10 minutos em PB 0,1 M, seguida da incubação com o anticorpo secundário biotilado goat anti-mouse por 2h. As reações foram desenvolvidas através da formação do complexo avidina-biotina-peroxidase (Kit ABC ELITE) e para a retirada do excesso de anticorpo que não foi ligado, novamente os cortes foram lavados por três vezes de 10 minutos em PB 0,1 M. Por fim, para a revelação utilizou-se o padrão DAB intensificado pelo Ósmio. Em seguida os cortes foram desidratados e fixados em solução de montagem, para posteriormente serem fotografados em microscópio óptico (Nikon, Eclipse E1000).

Para a imuno-histoquímica de fluorescência realizou-se a incubação do anticorpo primário durante 24 h *free-floating*, diluídos em uma solução de PB 0,2 M contendo Triton X-100 0,3% e soro de cabra a 5% (Jackson ImmunoResearch, PA, EUA). Após este período os cortes foram lavados por três vezes de 10 minutos em PB 0,1 M, seguidos da incubação com o anticorpo secundário fluorescente goat anti-mouse e goat anti-rabbit (de acordo com o anticorpo primário em questão) por 2 horas e lavados por três vezes de 10 minutos em PB 0,1 M. No protocolo de dupla marcação as etapas mencionadas foram repetidas para o segundo anticorpo. Em seguida os cortes foram colocados em solução de montagem e selados com o meio VECTASHIELD® HardSet™ Antifade com DAPI, para posteriormente serem fotografados em microscópio de Fluorescência (Nikon, Eclipse E1000) e o microscópio Confocal Zeiss LSM 880.

Anticorpos primários: tirosina hidroxilase (1:500; Chemicon, Temecula, CA, EUA) e pGSK-3 (1:250; Abcam, Cambridge, Reino Unido).

## 4.7 Real Time PCR

### 4.7.1 Extração de RNA

Para a extração do RNA total foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de Tri-Reagent-LS (Ambion, EUA) aos tubos eppendorffs contendo o tecido congelado, seguido de homogeneização sobre gelo. Após a homogeneização foi adicionado Tri-Reagent-LS para volume final de 1000  $\mu\text{L}$  de. A seguir foi adicionando 200  $\mu\text{L}$  de clorofórmio seguindo-se agitação em vórtex e descanso por 10 min em temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g, durante 15 min, a 4°C, etapa na qual são formadas três fase, sendo a fase superior que contém o RNA (aproximadamente 400  $\mu\text{L}$ ) transferida para um novo tubo.

### 4.7.2 Purificação do RNA.

Foram adicionados a cada amostra 600  $\mu\text{L}$  de isopropanol para a precipitação do RNA, seguido por agitação em vórtex e descanso por 10 min em temperatura ambiente. Após seguiu-se centrifugação a 12.000 x g, durante 35 min, a 4°C. Após essa etapa, descartou-se o sobrenadante e ao pellet foi adicionado 1 ml de álcool 75% gelado, vortexando a amostra, e centrifugando a 12.000 x g, durante 15 min, a 4°C. A lavagem do pellet com álcool 75% foi feita duas vezes, após o que a fase líquida foi descartada e o pellet submetido a secagem em bancada por cerca de 5-10 min até que o álcool evaporasse. O RNA contido no fundo do tubo foi ressuspensionado em 12  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O DEPC.

Para remoção de eventual contaminação com DNA genômico, o RNA foi tratado com DNase (kit *turboDNA-free*<sup>TM</sup>, Life Technologies, CA, EUA): a cada amostra, adicionou-se 10% do volume de *Turbo DNase Buffer*, 1  $\mu\text{L}$  de *Turbo DNase*, seguindo-se incubação de 30 min, a 37 °C. Logo após, foram acrescentados 10% do volume do reagente de inativação de *DNase*, seguindo-se incubação por 2 min em temperatura ambiente, período durante o qual as amostras foram agitadas 2 a 3x. Após centrifugação a 10.000 x g por 2 min, o sobrenadante contendo o RNA foi transferido para um novo *ependorf* e a concentração de RNA foi determinada por

leitura a OD<sub>260</sub> e a qualidade pela razão OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, DE, EUA).

#### 4.7.3 Síntese de cDNA

A reação de transcriptase reversa (RT-PCR) foi realizada com 1 µg de RNA total, utilizando-se 1 µL de oligonucleotídeos hexâmeros randômicos 50 ng/µL, 1 µL de dNTPs 10 mM, 4,75 µL de tampão de PCR 5X, 1 µL de DTT 10 mM, 1 µL de inibidor de ribonuclease 40 U/µL, e 0,25 µL de Superscript III 200 U/µL, para volume final de 20 µL por amostra. O cDNA sintetizado (50ng) foi utilizado nas reações de PCR quantitativo.

#### 4.7.4 Reações de PCR quantitativo (qPCR)

Os pares de *primers* específicos para cada gene utilizados nos protocolos abaixo (Tabela 1) foram baseados nas sequências obtidas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), abrangendo introns, desenhados pelo programa *Primer Quest* (IDT, IA, EUA) e sintetizados pela IDT. Foi utilizado os genes *36b4*, *Rpl37a* e *Gapdh* como normalizador dos experimentos.

A análise da expressão gênica foi realizada por meio da técnica de PCR em tempo real através do método de quantificação *SYBER Green*, utilizando-se o equipamento Quantum Studio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems, EUA). Foram preparadas soluções contendo os *primers* nas concentrações de 300 nM para genes de interesse e mix Power SYBER Green 2x (Applied Biosystems, EUA) em um volume final de 5 µL. As soluções foram distribuídas nos poços da placa experimental de 384 poços já contendo 1 µL cDNA (10ng). Os ciclos de amplificações foram: (1) Etapa inicial de ativação enzimática a 50 °C por 1 minutos seguido 95 °C por 10 minutos. (2) 50 ciclos que incluem desnaturação a 95 °C por 15 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto; (3) análise do *melting* que consiste em 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e posterior aumento gradual de 0,5 °C até atingir 95 °C para obtenção das curvas de *melting*.

O fluoróforo *SYBR Green* intercala-se ao DNA durante sua amplificação, promovendo um aumento da fluorescência (Nath *et al.*, 2000). O *SYBR Green* se intercala a qualquer fita de

DNA que está sendo amplificada, não sendo específico. Para determinar se houve a amplificação de produtos inespecíficos, foram obtidas *melting curves*. Durante essa fase, a temperatura é aumentada em 0,5°C a intervalos de tempo determinados e a fluorescência dos poços obtida em cada fase. As curvas ideais mostram apenas um pico de queda de fluorescência em cada poço, numa temperatura que coincide com a *melting temperature* do produto esperado (quando o produto se dissocia). Quando produtos inespecíficos são detectados eles formam outro (s) pico (s) de fluorescência em diferentes temperaturas, sendo esses poços imediatamente excluídos da análise.

**Tabela 1-** Sequências de primers utilizados para a realização da RT-PCR:

Lista de Primers	
mTH For: TACAAGCAGGGTGAGCCAAT	mTH Back: GCTGTGGAATGCTGCCTCT
mCasp3 For: AGCAAGTCAGTGGACTCTGG	mCasp3 Back: CAGAGCGAGATGACATCCAGT
mAKT For: CCGTGTGACCATGAACGAGT	mAKT Back: GGTCGTGGGTCTGGAATGAG
mGAPDH For: TGGAAAGCTGTGGCGTGATG	mGAPDH Back: TACTTGGCAGGTTTCTCCAGG
mGSK3b For: TGGACAAAGGACTCACCAGG	mGSK3b Back: AAGAGTGCAGGTGTGTCTCG

#### 4.8 Immunoblotting

Os animais foram previamente eutanasiados (n=4/5 por grupo). As regiões da SN e do estriado foram coletadas e homogeneizadas a 4°C em um tampão de lise RIPA 1X (Merck Millipore, Burlington, EUA) previamente acrescido de um cocktail de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma Aldrich). Em seguida as amostras foram trituradas com o auxílio do Polytron® ou o Processador Ultrassônico (sonicador). A suspensão formada foi centrifugada por 20 min, a 12.000 rpm, na temperatura de 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi armazenado e o pellet descartado. A quantificação de proteínas totais das amostras foi realizada em triplicata, pelo método de BCA (ácido bicinchonínico) (Sigma Aldrich) para detecção colorimétrica, sob um comprimento de onda de 570 nm. As alíquotas normalizadas em 15 µg de proteínas totais foram reduzidas em tampão de corrida Laemmli Sample Buffer 2X (BioRad, Hercules, CA, EUA) contendo de Ditiotretitol 0,1 M (VWR, Radnor, PA, EUA) e incubadas a 80°C por 5 minutos. Em seguida, foram aplicadas, juntamente com um padrão de massa molecular específico (BioRad, Hercules, CA, EUA), em gel de poliacrilamida-SDS (8 a 15%, com espessura de 1,5 mm), o qual foi submerso em tampão de eletroforese (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM,



pH 7,3). A corrida das amostras 8 no gel foi efetuada a 100 V e interrompida quando a linha do corante de azul de bromofenol atingiu a extremidade inferior do gel.

Após a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, os peptídeos contidos no gel foram transferidos para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). As membranas foram previamente imersas em tampão de transferência (Tris base 25 mM, Glicina 192 mM, CH<sub>3</sub>OH 20%). Para a realização da transferência, foi empregado um sistema tipo “sanduíche”, submerso em tampão de transferência, sobre o qual foi aplicada uma voltagem de 100 V, durante 1h. Após esse período, as membranas foram transferidas para uma solução de bloqueio [(NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7,2 mM, albumina de soro bovino (BSA) 5%, Tween 20 (0,1 %, Sigma Aldrich)] durante uma hora, com o intuito de bloquear possíveis ligações inespecíficas. Em seguida, as membranas permaneceram incubadas com anticorpo primário específico, previamente diluído em solução de bloqueio, por 18 horas, a 4°C, com leve agitação. Para remoção do excesso do anticorpo, foram realizadas 3 lavagens com tampão Tris-salina-Tween 0,1% 1x (TBS-T) (por 10 min cada). Em seguida, as membranas foram incubadas por mais 2 horas com o anticorpo secundário conjugado apropriado (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore, MD, USA), em solução de bloqueio e novamente lavadas como acima descrito. Após essas etapas, as membranas foram expostas ao reagente ECL TM (GE Healthcare) para detecção através de quimiluminescência, por 2 min. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Para a quantificação das bandas foi utilizado o software ImageJ (National Institute of Mental Health). No estriado e na Substância Negra, as proteínas avaliadas foram: GSK-3 (Abcam 1:1000), phospho GSK-3 (Y216+Y279) (Abcam 1:1000); GAPDH (cell signaling 1:1000).

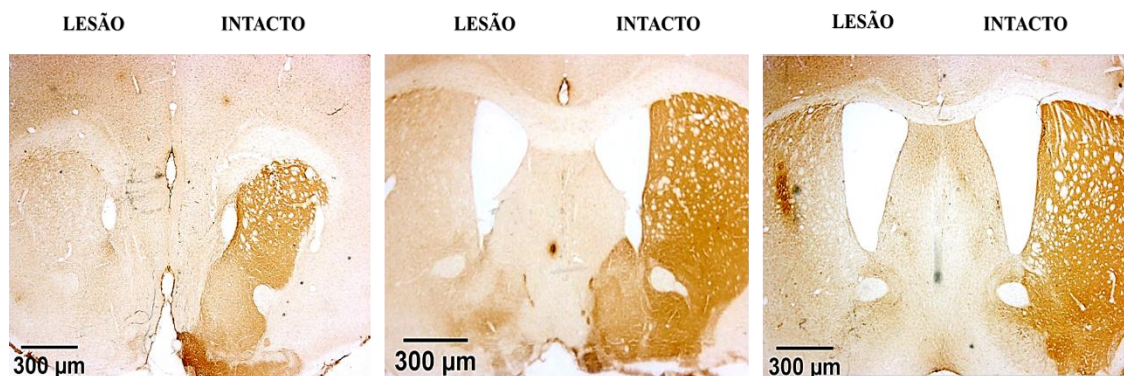
## 5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância ANOVA, *two-way* completamente randomizada, seguida pelo pós teste de *Bonferroni*. Todos os dados foram normalizados e analisados no *software GraphPad Prism*. Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significativos. Os resultados estão apresentados como um valor médio  $\pm$  erro padrão.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Padronização da concentração de 6-OHDA

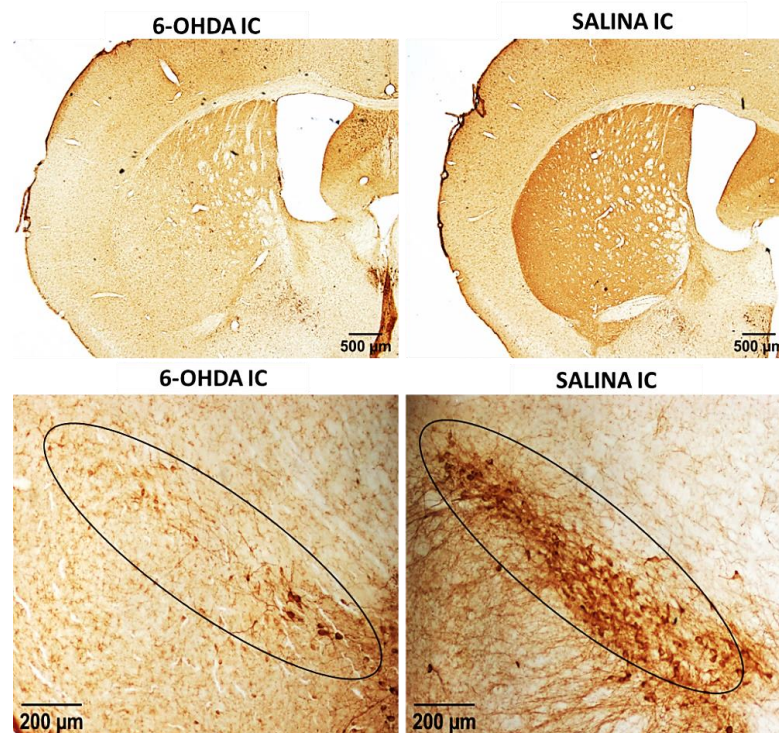
O local de injeção da 6-OHDA foi reproduzido conforme descrito no artigo de Chen e colaboradores: (Ponto 1: A (anterior): +1.0 mm; ML (médio-lateral): 2,0 mm em relação ao bregma e DV (dorso-ventral): 2,9 mm em relação a dura-máter. Ponto 2: P (posterior): - 0,3 mm; ML: 2,3 mm em relação ao bregma e DV: 2,9 mm em relação a dura-máter (CHEN et al., 2017). Entretanto, após a escolha das coordenadas intraestriais responsáveis por induzir a lesão retrógrada na SN, foram testadas duas concentrações de 6-OHDA (4 e 12  $\mu\text{g}$ ) com o intuito de comparar o efeito da 6-OHDA quanto a intensidade da lesão nas diferentes concentrações e os resultados foram demonstrados nas Figuras 6 e 7 respectivamente. Para avaliar tal feito, utilizamos a técnica de imunomarcção do anticorpo anti-TH. A TH é uma enzima precursora das catecolaminas que no caso dos neurônios dopaminérgicos da SN, origina a dopamina e marca a presença destes grupos de neurônios na região de estudo (HOU et al., 2015; ALAM; RICHARDSON, 2020).



**Figura 6** – Figura representativa da progressão da lesão induzida pela administração da concentração de 12  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA no hemisfério lesionado em comparação ao não lesionado, nas coordenadas padronizadas por Cheng e colaboradores, ao longo do estriado de um camundongo C57BL/6J. A coloração foi obtida pela imuno-marcação para tirosina hidroxilase (TH) e corada pela técnica de imuno-histoquímica pelo método da peroxidase utilizando o complexo avidina-biotina (ABC) e o tetracloreto de diaminobenzidina (DAB). As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Microscópio – Nikon Eclipse E1000, Câmera de captura – Nikon DXM1200), objetiva de 4x e escala de 300  $\mu\text{m}$  (CHEN et al., 2017a).

A lesão obtida após a administração da concentração de 12  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA intraestriatal, atingiu praticamente todo o núcleo estriado e promoveu uma discrepância na

coloração de TH do hemisfério direito, onde a neurotoxina foi veiculada (devido a morte dos neurônios dopaminérgicos), quando comparado ao hemisfério esquerdo que não passou pelo procedimento cirúrgico (Figura 6). A desvantagem na administração de 6-OHDA em uma dose tão elevada, está na sobrevivência dos camundongos submetidos a este procedimento. Estes animais não sobreviveram mais que 7 dias após o procedimento cirúrgico. Acredita-se que a morte dos neurônios dopaminérgicos nestas regiões tenha sido tão exacerbada que resultou nos sintomas de instabilidade postural e tremor de descanso, que dificilmente são percebidos em modelos animais de DP em doses mais baixas. Além disso, os camundongos que receberam 12  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA intraestriatal, encontravam-se muito debilitados e não conseguiam comer ou mesmo movimentar-se, comprometendo assim o nosso desenho experimental de 15 dias de sobrevivência após a lesão pela 6-OHDA. Devido a esta constatação, outro problema estaria em debate: o tratamento com o LiCl provavelmente não teria efeito neuroprotetor nos neurônios dopaminérgicos, pois os animais estariam em um quadro de DP extremamente avançado e a morte dopaminérgica já estaria instaurada. Buscando sanar estes problemas, testamos a concentração proposta pelo artigo de trabalho (CHEN et al., 2017a) e concluímos que a lesão após a administração da concentração de 2  $\mu\text{g}$  por ponto (4  $\mu\text{g}$  no total), demonstrado na Figura 7, seria adequada para induzir o modelo de DP e o tratamento com LiCl tornou-se viável pois a lesão estaria apenas em algumas secções do estriado e não no estriado todo. Ao mesmo tempo, esta concentração (4  $\mu\text{g}$  de 6-OHDA no total) é ideal porque promove uma lesão retrógrada atingindo os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos da SNpc.

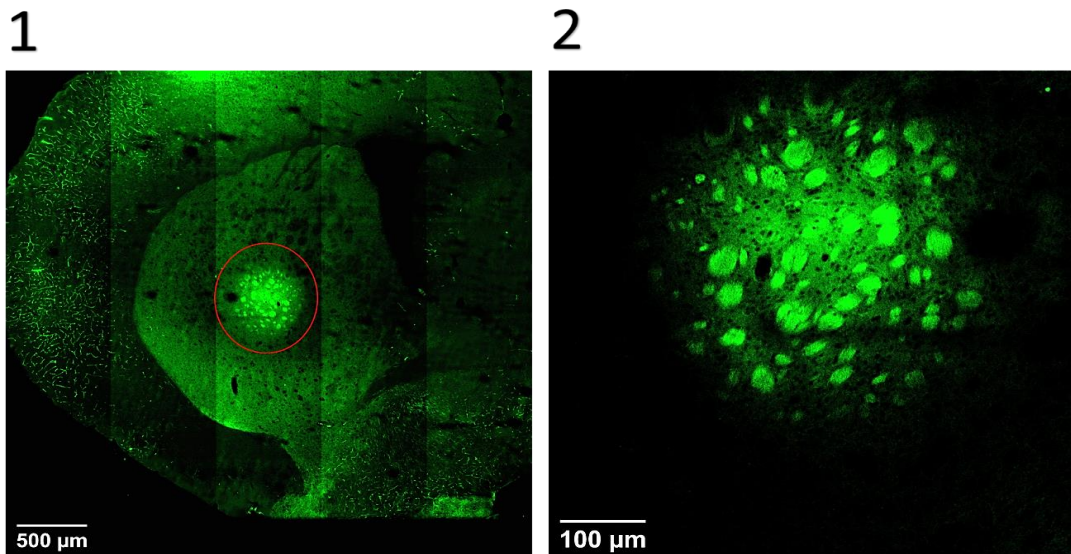


**Figura 7** – Imagem representativa da marcação de TH no estriado e na substância negra de camundongo C57BL/6J 15 dias após a administração de 4 µg de 6-OHDA veiculadas através de uma microsseringa Hamilton®, nas coordenadas estereotáxicas padronizadas. A 6-OHDA foi administrada unilateralmente no hemisfério direito que apresenta uma menor imunomarcação para TH quando comparada ao animal controle (Salina IC). TH (tirosina hidroxilase – Chemicon, Milipore MAB5280, diluição de 1:2000). As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Microscópio – Nikon Eclipse E1000, Câmera de captura – Nikon DXM1200).

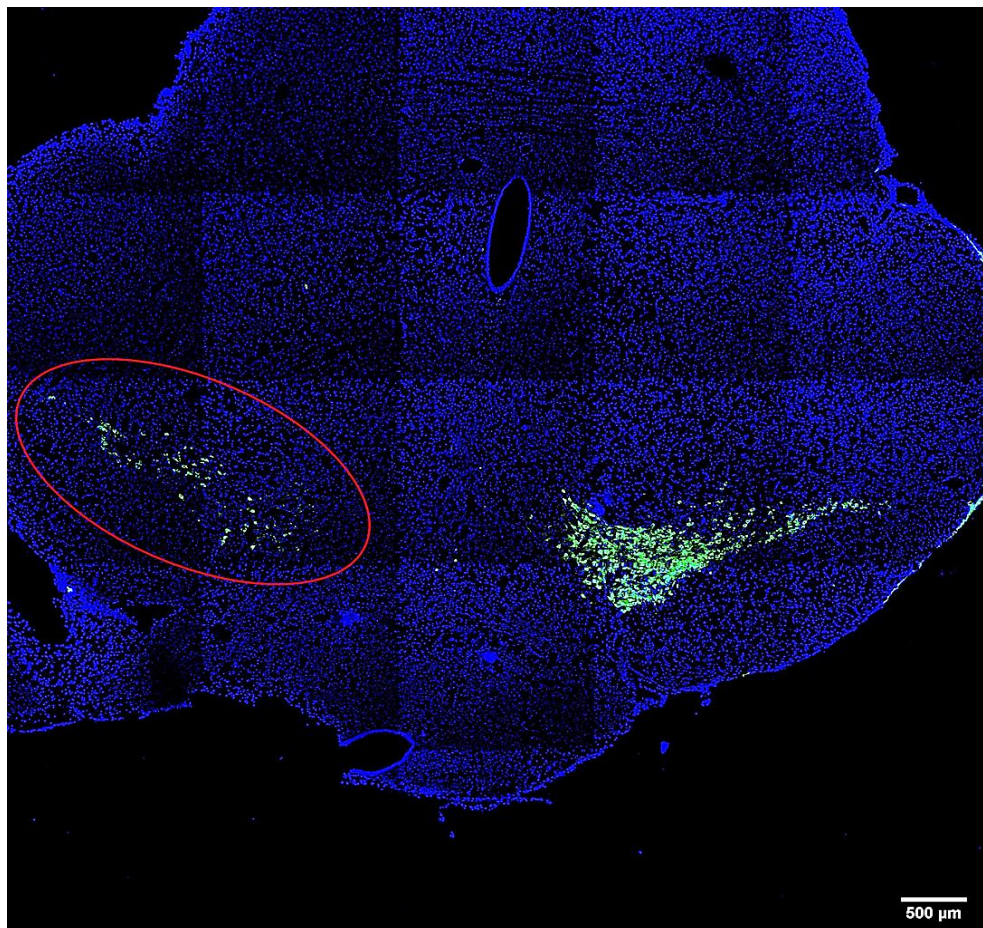
## 6.2 Lesão induzida por 6-OHDA 24 horas após o procedimento cirúrgico

Após a padronização da concentração da 6-OHDA, determinamos se a lesão estava instaurada ou não antes de iniciarmos o tratamento intraperitoneal com o LiCl (inibidor da GSK-3 $\beta$ ). Para tal, foi realizada a imunomarcação pela técnica de imuno-histoquímica de fluorescência para o anticorpo TH 24 horas após a veiculação da 6-OHDA intraestriatal, nos neurônios dopaminérgicos da SNpc e de suas projeções estriatais.





**Figura 8** – Local da injeção de 6-OHDA situada entre a região do estriado dorsal e do estriado ventral 24 horas após a administração da 6-OHDA obtida pela fluorescência de TH. 1 – Imagem obtida utilizando a ferramenta tile scan. 2- Visualização do local da injeção de 6-OHDA através da objetiva de 10x e a escala de captura foi de 100 µm. As fotomicrografias foram capturadas em microscópio Confocal Zeiss LSM 880 através do laser 488 (verde).

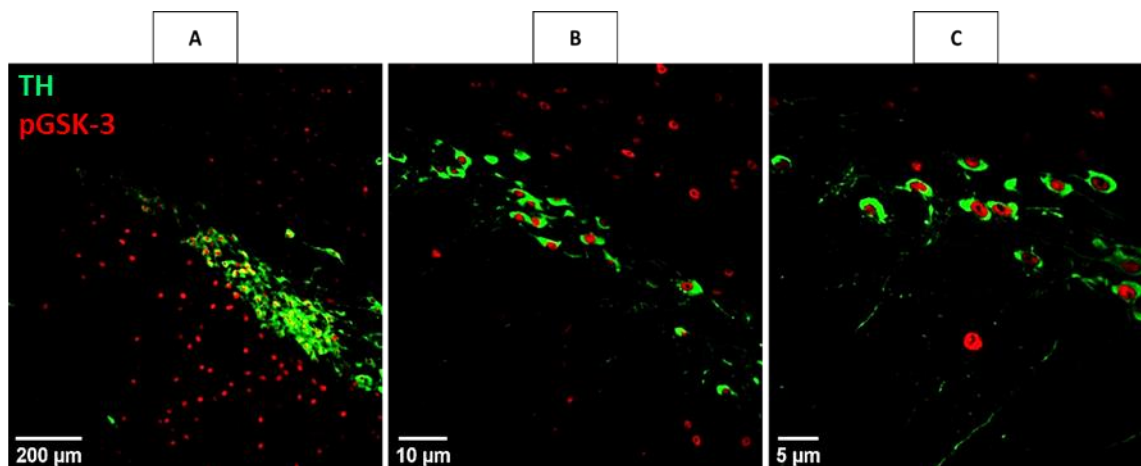


**Figura 9** – Imagem representativa da lesão retrógrada na região do mesencéfalo de camundongo C57BL/6J, 24 horas após a administração de 6-OHDA. A circunferência em vermelho delimita a fluorescência emitida dos neurônios dopaminérgicos da SN que expressam TH no hemisfério direito que sobreviveram a administração de 4 µg de 6-OHDA veiculada por meio de uma microseringa Hamilton® nas coordenadas estereotáxicas padronizadas. A imagem foi obtida utilizando a ferramenta tile scan. A fotomicrografia foi capturada em microscópio Confocal Zeiss LSM 880 através do laser 488 para TH (verde) e 405 para o DAPI (azul).

Na Figura 8 nós podemos observar que a 6-OHDA encontra-se depositada na região estriatal no local em que foi administrada por cirurgia estereotáxica e que não foi difundida por completo devido ao período recente (24 horas após o procedimento cirúrgico). Além do mais a 6-OHDA administrada IC foi capaz de promover a morte neuronal na região da SN e da área tegmental ventral (VTA), observadas pela imunofluorescência de TH reduzida no hemisfério direito que passou pelo procedimento cirúrgico quando comparado ao hemisfério contrário que não passou pelo procedimento cirúrgico (Figura 9).

### 6.3 Localização da pGSK-3 ativa no mesencéfalo de camundongos C57BL/6J

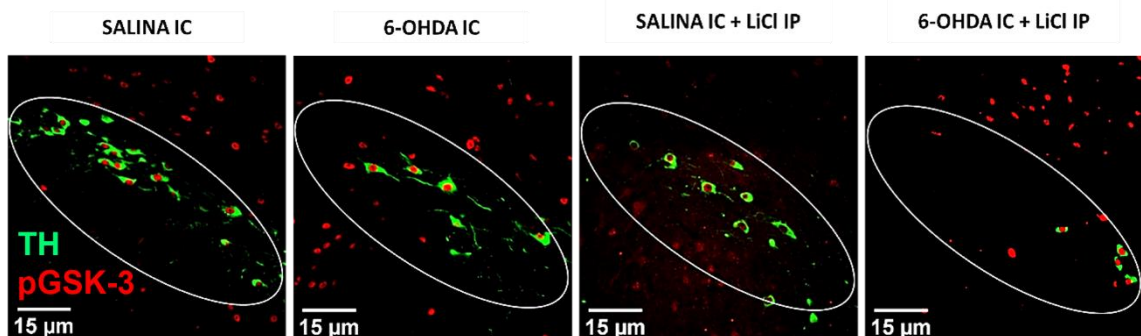
A morte neuronal dopaminérgica validada a partir da redução na expressão da enzima TH nos animais que foram submetidos ao insulto, ativa inúmeras cascatas de sinalização celular. Dentre os sinalizadores envolvidos com a morte neuronal dopaminérgica da SN podemos citar a enzima GSK-3 na sua conformação ativa e em vista disso, aqui demonstramos por meio de uma dupla marcação com TH, a disposição de pGSK-3 ativa na região da SNpc em um animal em que se injetou apenas uma solução salina intracerebral (Figura 10) e nos nossos grupos de estudo (Figura 11) (GU et al., 2017; YANG et al., 2017).



**Figura 10** - Imagens ilustrativas da dupla marcação de TH e pGSK-3 ativa, na região da SNpc de um camundongo C57BL/6J, no qual, foi injetada apenas solução salina nas coordenadas estereotáxicas padronizadas. As

imagens do mesmo corte foram capturadas em 3 objetivas distintas A: A escala de captura foi de 200  $\mu\text{m}$  para a objetiva de 20x. B: A escala de captura foi de 10  $\mu\text{m}$  para a objetiva de 40x. C: A escala de captura foi de 5  $\mu\text{m}$  para a objetiva de 63x. As imagens foram obtidas por meio do microscópio Confocal Zeiss LSM 880, através do laser 488 para TH (verde) e 594 para a pGSK-3 (vermelho).

A Figura 10 demonstra um corte do mesencéfalo em vários aumentos possibilitando a observação de algumas características peculiares da enzima pGSK-3 ativa nesta região. Em primeiro lugar, a pGSK-3 está localizada na substância negra de camundongos C57BL/6J e parece estar dispersa em todo o mesencéfalo, não apenas na região da SNpc. Esta constatação pode ser indicativa de que esta enzima pGSK-3 ativa, atue em neurônios dopaminérgicos e em células gliais como encontrado por Xing e colaboradores que observaram o papel pró-apoptótico da GSK-3 $\beta$  em diferentes células de oligodendrócitos (XING et al., 2018). Em segundo momento, relatamos a disposição da marcação do anticorpo pGSK-3 ativa. Esta quinase apresenta características de marcação perinuclear, sugerindo um provável efeito desta enzima no núcleo dos neurônios dopaminérgicos da SN semelhante ao que foi proposto por Thornton e colaboradores, onde se é relatado a existência de um efeito nuclear da enzima GSK-3 $\beta$  no córtex e no hipocampo (THORNTON et al., 2018).



**Figura 11** - Micrografias confocais representativas da SNpc de camundongo C57BL/6J, mostrando a dupla marcação entre TH e pGSK-3 na sua forma ativa (Y216 e Y279) nos respectivos grupos: Salina IC, 6-OHDA IC, Salina IC + LiCl IP e 6-OHDA IC + LiCl IP. As imagens foram obtidas por meio do microscópio Confocal Zeiss LSM 880 através do laser 488 para TH (verde) e 594 para a pGSK-3 (vermelho) na objetiva de 40x e escala de captura de 15  $\mu\text{m}$ .

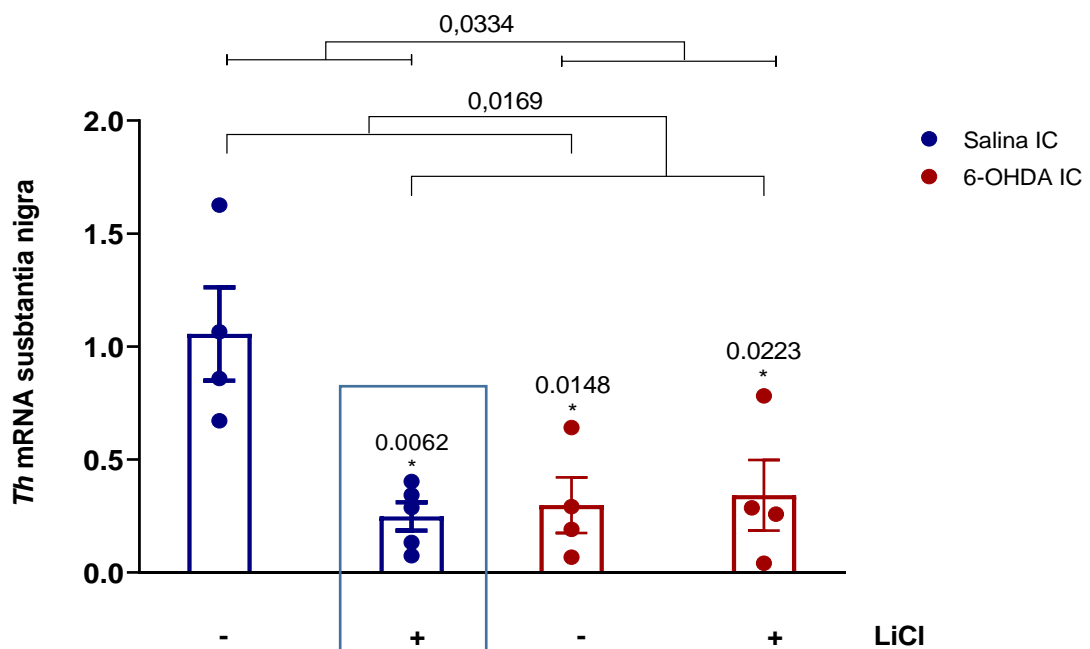
A Figura 11 retrata a disposição de pGSK-3 (sendo que o nosso anticorpo abrange a conformação ativa das isoformas GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$ ) nos grupos experimentais (Salina IC, 6-OHDA IC, Salina IC + Cloreto de Lítio IP e 6-OHDA IC + Cloreto de Lítio IP) ao longo da



SN, em dupla marcação com a enzima TH. A enzima pGSK-3 aparenta estar disposta em todos os nossos grupos experimentais. Porém as imagens representativas dos animais que foram expostos aos grupos, 6-OHDA IC, Salina IC + LiCl IP e 6-OHDA IC + LiCl IP são sugestivas do aumento na expressão desta enzima. Para melhores abordagens investigamos os efeitos da GSK-3 em metodologias quantitativas que serão detalhadas a seguir.

#### 6.4 Análise da expressão gênica de TH, AKT, GSK-3 $\beta$ e Caspase-3 por RT-PCR:

Após induzir a lesão intraestriatal através da veiculação de 6-OHDA unilateral, nós do-  
samos a expressão gênica de TH na região do mesencéfalo onde encontra-se situado o corpo  
celular dos neurônios dopaminérgicos (BAGGA; DUNNETT; FRICKER, 2015). Existem im-  
portantes respaldos na literatura de que a expressão de mRNA TH em modelos de 6-OHDA,  
sofre uma redução significativa em relação ao grupo controle (KASTNER et al., 1993; CHEN  
et al., 2017b). Além disso, podemos quantificar o efeito neuroprotetor/neurotóxico exercido  
pelo tratamento com o LiCl nos neurônios dopaminérgicos através da determinação mRNA de  
TH.



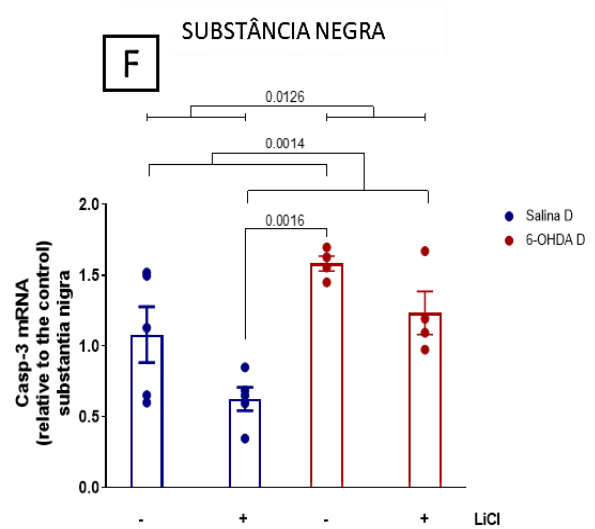
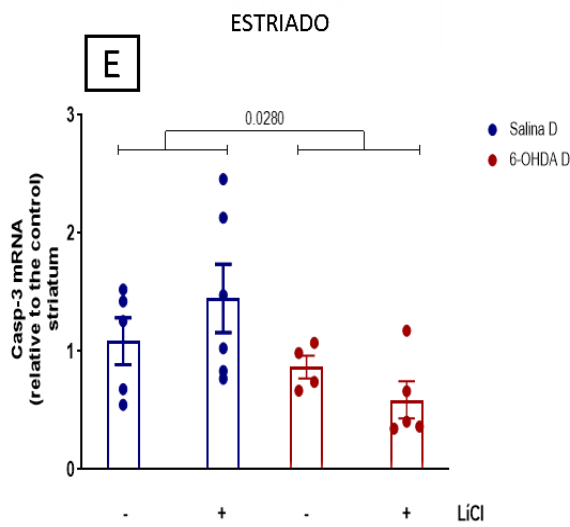
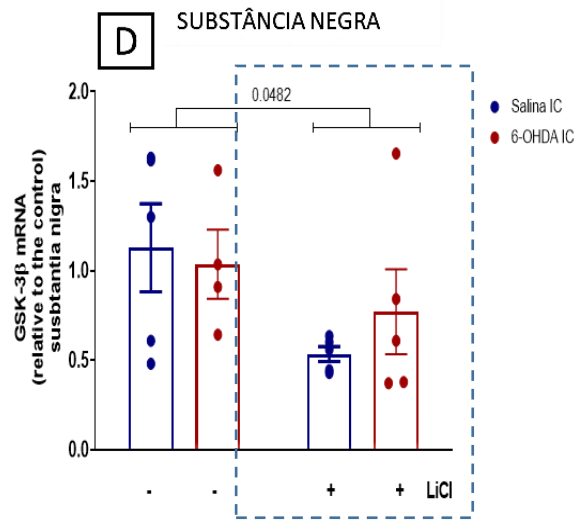
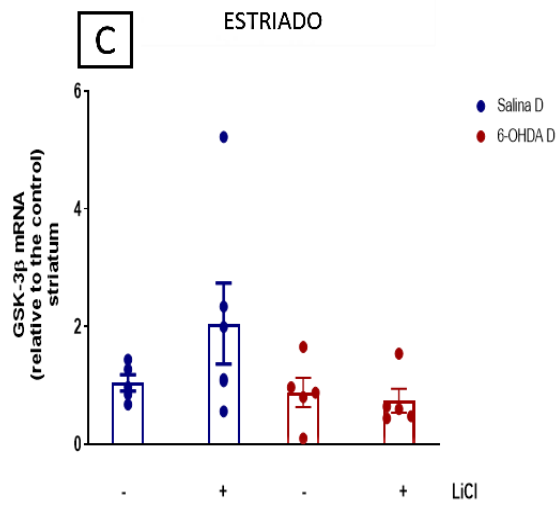
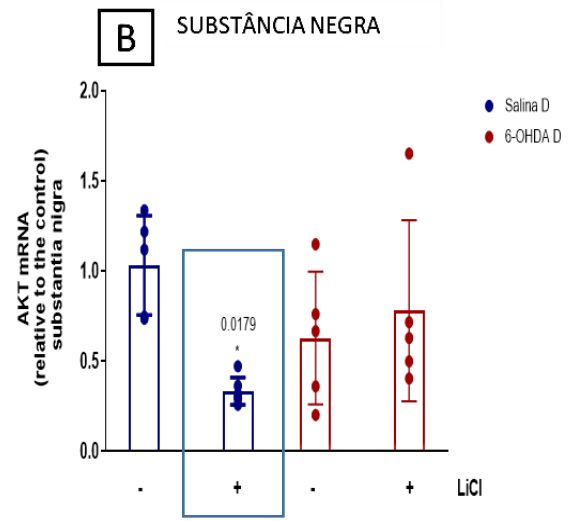
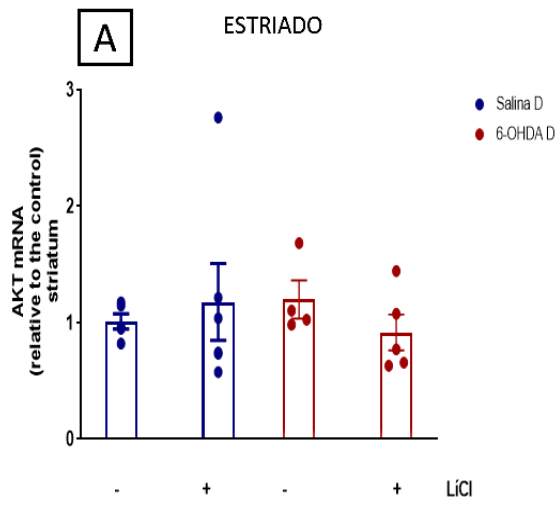
**Figura 12** - Gráfico da expressão gênica de TH na região da Substância Negra. Os resultados de PCR quantitativo foram analisados através do método de  $\Delta\Delta CT$ . Após o conhecimento CT, é encontrado o  $\Delta CT$  que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e o valor de amplificação do gene normalizador (36b4) da mesma amostra de cDNA (ambos correspondendo à média de poços duplicados do mesmo cDNA). A seguir, obtém-se o  $\Delta\Delta CT$

subtraindo a média do grupo controle Salina IC dos valores encontrados para cada amostra dos grupos controle e experimentais sendo exponencial negativo na base 2 ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) e esse valor foi utilizado nas análises estatísticas. As possíveis diferenças entre o grupo controle (Salina IC e IP) e os grupos experimentais (6-OHDA IC e 6-OHDA IC + LiCl IP) foram analisadas por Two-Way ANOVA seguida pelo pós teste de Bonferroni. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . \*comparação em relação ao grupo Salina IC que não recebeu LiCl. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1. Este gráfico apresenta os dados expressos como  $\pm$  EPM de 4 ou 5 animais de acordo com o grupo experimental.

Os dados representados na Figura 12, sugerem que a administração de 6-OHDA IC causa uma redução na expressão gênica da enzima TH [ $p=0,0334$ ,  $F(1, 13) = 5,661$ ] em comparação aos animais que não receberam a droga. Ao mesmo tempo, foi constatado que o tratamento com LiCl também levou à redução na TH na substância negra [ $p=0,0169$ ,  $F(1, 13) = 7,504$ ] e a presença de efeito de interação entre os fatores [ $p=0,7624$ ,  $F(1, 13) = 9,309$ ]. A execução do pós-teste de Bonferroni mostrou, ainda, que os animais dos grupos 6-OHDA IC, Salina IC + LiCl e 6-OHDA IC + LiCl apresentam redução na expressão da TH quando comparados com o grupo Salina IC ( $p=0,0148$ ,  $p=0,0062$ ,  $p=0,0223$ , respectivamente).

Ainda no estudo das vias que podem ser responsáveis pela deleção neuronal dopaminérgica, avaliamos a expressão gênica da Caspase-3 na SN e no núcleo estriado (Figura 13 E e Figura 13 F). Esta importante sinalizadora de morte neuronal, pode contribuir com a identificação dos possíveis mecanismos pelos quais foram promovidas as reduções na expressão de mRNA TH induzida pelo modelo de DP e pelo tratamento com o LiCl. É importante mencionar que os valores referentes a expressão gênica da Caspase-3 não excluem a presença da sua sinalização apoptótica (intrínseca/extrínseca) em outros períodos da lesão. A escolha do estudo da Caspase-3, está no seu papel importante derivado das características de morte proporcionadas pelo modelo de 6-OHDA (CALLIZOT et al., 2019).

Além disso, avaliamos também a expressão gênica de AKT e GSK-3 $\beta$  (Figura 13 A, Figura 13 B, Figura 13 C e Figura 13 D). Estas enzimas são altamente influenciadas e moduladas pelo tratamento com LiCl (QIAO et al., 2017). Em vista disso, resolvemos quantificar o efeito deste fármaco a nível de expressão gênica, pois assim, teremos dados sugestivos dos mecanismos pelos quais ocorre a neurotoxicidade do LiCl aqui demonstrada a partir da redução de mRNA TH nos neurônios dopaminérgicos da SN.



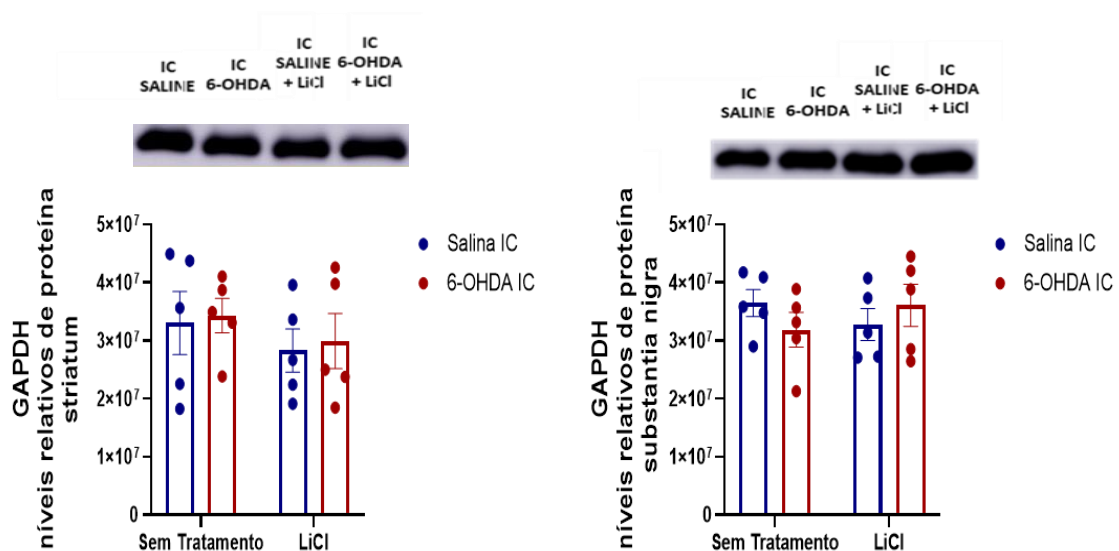
**Figura 13** - Gráficos da expressão gênica de AKT, GSK-3 $\beta$  e Caspase-3 nas regiões do Estriado e da Substância Negra. Os resultados de PCR quantitativo foram analisados através do método de  $\Delta\Delta C_T$ . Após o conhecimento  $C_T$ , é encontrado por  $\Delta C_T$  que é a diferença entre esse valor para o gene de interesse e o valor de amplificação do gene normalizador (*36b4*) da mesma amostra de cDNA (ambos correspondendo à média de poços duplicados do mesmo cDNA). A seguir, obtém-se o  $\Delta\Delta C_T$  subtraindo a média do grupo controle Salina IC dos valores encontrados para cada amostra dos grupos controle e experimentais sendo exponencial negativo na base 2 ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) e esse valor foi utilizado nas análises estatísticas. As possíveis diferenças entre o grupo controle (Salina IC e IP) e os grupos experimentais (6-OHDA IC e 6-OHDA IC + LiCl IP) foram analisadas por Two-Way ANOVA seguida pelo pós teste de Bonferroni. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . \*comparação em relação ao grupo Salina IC. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1. Estes gráficos apresentam os dados expressos como  $\pm$  EPM de 4, 5 ou 6 animais de acordo com o grupo experimental.

Os gráficos da Figura 13 apresentam os dados referentes à análise da expressão gênica de AKT, GSK-3 $\beta$  e Caspase-3 no estriado e na substância negra. A análise dos dados por two-way ANOVA revela que: (A) quanto à expressão gênica da AKT no estriado, não houve diferença estatística em relação à cirurgia [ $p=0,8730$ ,  $F(1, 16) = 0,02640$ ], ao tratamento [ $p=0,8048$ ,  $F(1, 16) = 0,06314$ ] ou à interação entre os fatores [ $p=0,3433$ ,  $F(1, 16) = 0,9539$ ]; (B) quanto à expressão gênica da AKT na substância negra, também não houve diferença estatisticamente significativa em relação à cirurgia [ $p=0,8855$ ,  $F(1, 17) = 0,02138$ ], ao tratamento [ $p=0,0786$ ,  $F(1, 17) = 3,502$ ], porém foi encontrada diferença estatística por interação entre os fatores [ $p=0,0096$ ,  $F(1, 17) = 8,500$ ], o pós-teste de Bonferroni realizado em seguida demonstrou redução estatisticamente significativa nos animais do grupo Salina IC + Cloreto de Lítio IP quando comparados com os animais do grupo Salina IC ( $p=0,0179$ ); (C) a análise da expressão gênica de GSK-3 $\beta$  no estriado não apontou diferença estatística em relação à cirurgia [ $p=0,1076$ ,  $F(1, 17) = 2,830$ ], ao tratamento [ $p=0,3308$ ,  $F(1, 17) = 1,002$ ] ou à interação entre os fatores [ $p=0,2029$ ,  $F(1, 17) = 1,754$ ]; (D) a expressão gênica de GSK-3 $\beta$  na substância negra encontra-se sem diferença estatisticamente significativa em relação à cirurgia [ $p=0,7186$ ,  $F(1, 15) = 0,1349$ ], ou à interação entre os fatores [ $p=0,4255$ ,  $F(1, 15) = 0,6712$ ], porém é encontrada uma redução na expressão de GSK-3 $\beta$  na substância negra dos animais tratados com LiCl quando comparados com os animais que não receberam o tratamento [ $p=0,0482$ ,  $F(1, 15) = 4,625$ ]; (E) referente à Caspase-3 no estriado, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando comparado o efeito do tratamento [ $p=0,8496$ ,  $F(1, 16) = 0,03716$ ] e interação entre fatores [ $p=0,1709$ ,  $F(1, 16) = 2,055$ ], todavia, quanto à cirurgia, os animais que

receberam 6-OHDA IC apresentaram uma redução na expressão gênica da Caspase-3 [ $p=0,028$ ,  $F(1, 16) = 5,840$ ]; (F) por fim, na substância negra, a expressão gênica da Caspase-3, quando avaliada a cirurgia, foi encontrado aumento da expressão nos animais que receberam 6-OHDA IC [ $p=0,0014$ ,  $F(1, 14) = 15,63$ ], quanto ao tratamento, os animais que receberam LiCl IP apresentaram uma redução na expressão da Caspase-3 [ $p=0,0126$ ,  $F(1, 14) = 8,174$ ], não houve diferença estatisticamente significativa quando avaliada a interação entre os fatores [ $p=0,7145$ ,  $F(1, 14) = 0,1393$ ] e, por sua vez, o pós-teste de Bonferroni mostrou que animais que receberam Salina IC e LiCl IP apresentam menor expressão da Caspase-3 do que os animais que receberam 6-OHDA IC e não receberam LiCl IP ( $p=0,0016$ ).

### 6.5 Análise da expressão proteica do GAPDH para o seu uso como proteína normalizadora:

Após a identificação dos mecanismos indutores da redução de mRNA TH na SN que envolvem a expressão gênica, resolvemos investigar os possíveis efeitos das modificações pós-traducionais da enzima GSK-3 que apresentam uma correlação direta com a depleção neuronal na SN e no estriado tanto no modelo de 6-OHDA, quanto no tratamento com LiCl (ZHAI et al., 2019). Para tal, utilizamos a técnica de immunoblotting e a proteína normalizadora escolhida foi o GAPDH.



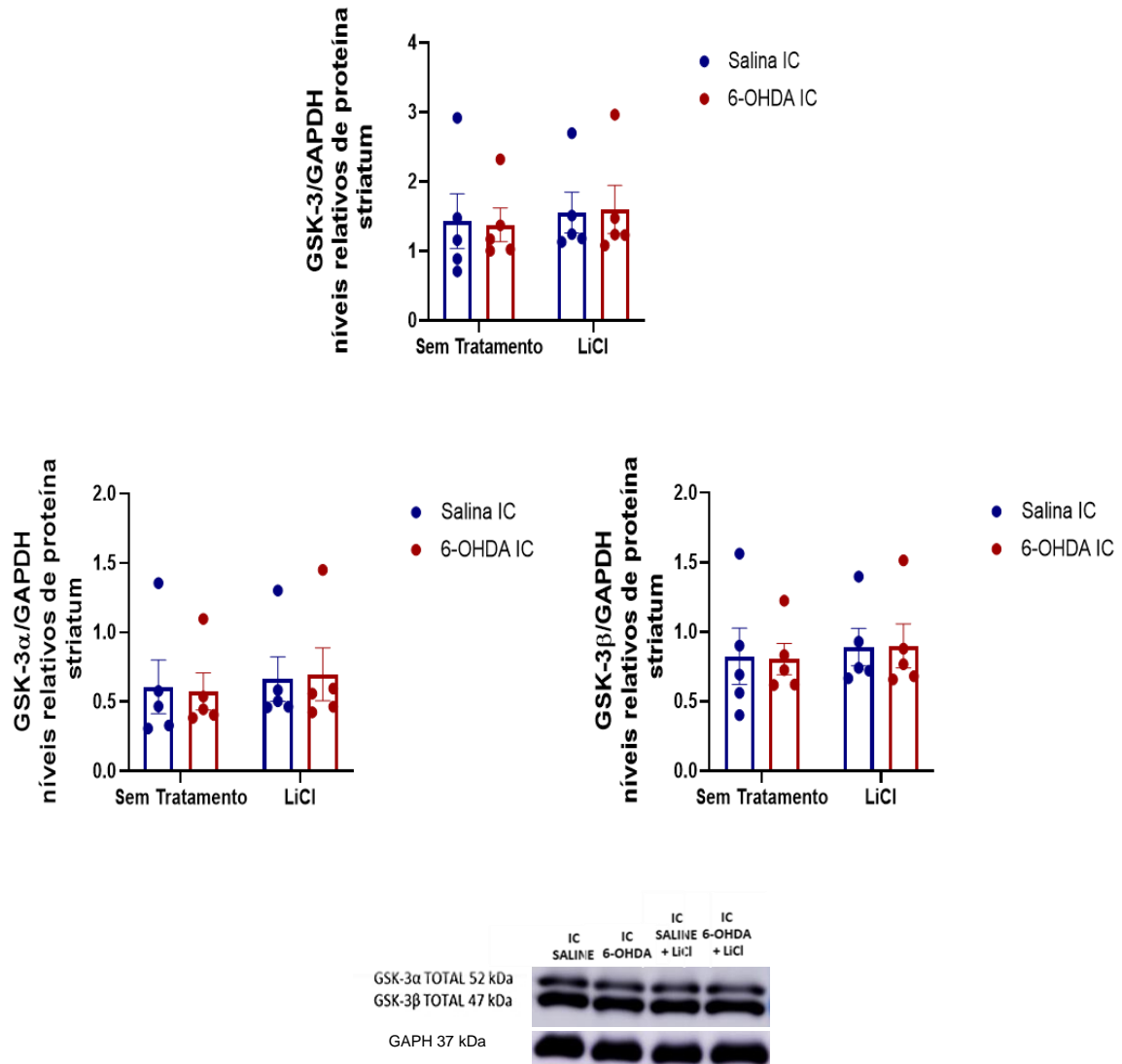
**Figura 14** - Análise da expressão de GAPDH no hemisfério experimental direito no estriado (striatum) e da substância negra (substantia nigra) por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os

dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Como é possível observar na Figura 14, a expressão de GAPDH no estriado encontra-se inalterada quando analisado por two-way ANOVA quanto ao efeito da cirurgia [ $p=0,7387$ ,  $F(1, 16) = 0,1152$ ], do tratamento [ $p=0,3066$ ,  $F(1, 16) = 1,116$ ] ou interação entre fatores [ $p=0,97$ ,  $F(1, 16) = 0,001462$ ]. Quando analisado na substância negra, o GAPDH também não apresentou diferença estatística na two-way ANOVA em relação aos efeitos da cirurgia [ $p=0,8343$ ,  $F(1, 16) = 0,0452$ ], do tratamento [ $p=0,9362$ ,  $F(1, 16) = 0,006617$ ] ou interação entre fatores [ $p=0,2008$ ,  $F(1, 16) = 1,780$ ]. Estes resultados validam o uso do GAPDH como proteína normalizadora para as análises por Western Blotting no estriado e na SN.

#### **6.6 Análise da expressão proteica de GSK-3, GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\alpha$ (Y279) e pGSK-3 $\beta$ (Y216) no estriado:**

Para quantificar o efeito da GSK-3 no estriado, realizamos a expressão proteica total da enzima GSK-3 e posteriormente quantificamos separadamente a expressão de GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  normalizadas pelo GAPDH. Assim podemos observar se as enzimas totais (não fosforiladas) exerciam efeito significativo em relação ao modelo de DP e ao tratamento com LiCl na região do estriado.

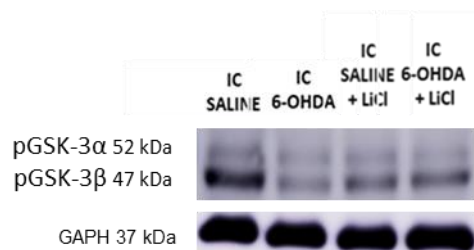
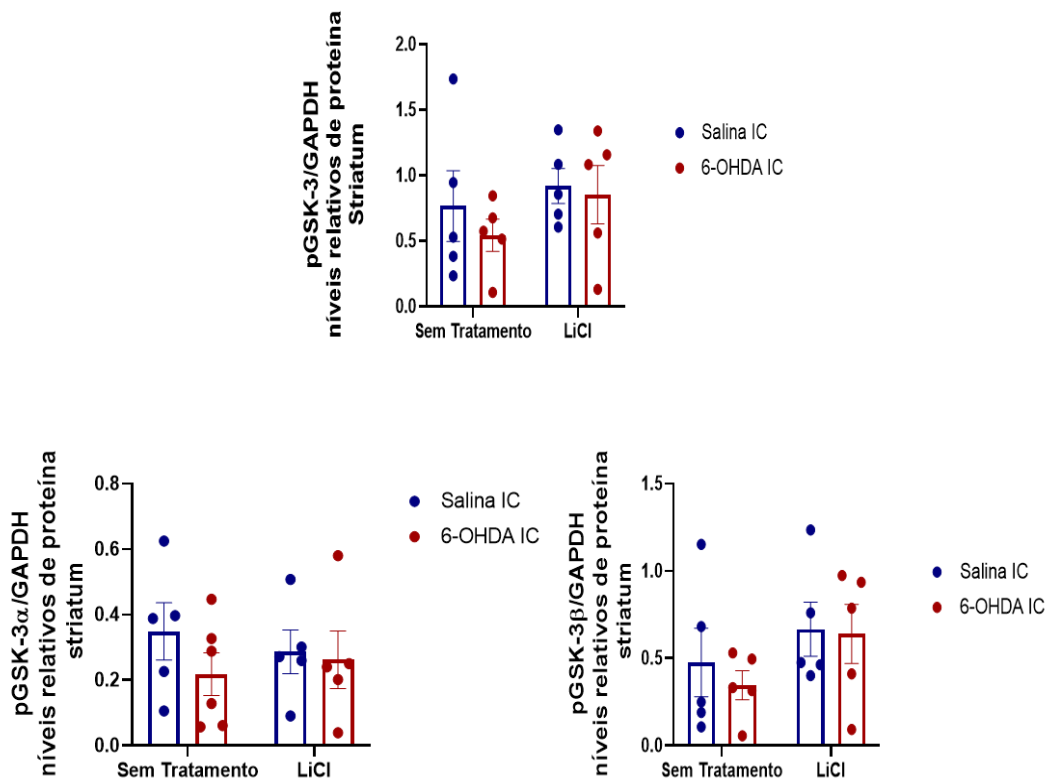


**Figura 15** - Análise da expressão proteica de GSK-3, GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  normalizadas por GAPDH no hemisfério experimental direito no estriado (striatum) por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 4-5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Quando analisados os dados representados da Figura 15, foi constatado que: (1) a expressão proteica de GSK-3 no estriado não foi alterada como efeito da cirurgia [ $p=0,7342$ ,  $F(1, 16) = 0,1194$ ], do tratamento [ $p=0,3247$ ,  $F(1, 16) = 1,033$ ] ou da associação dos fatores

[ $p=0,7414$ ,  $F(1, 16) = 0,1127$ ]; (2) GSK-3 $\alpha$  não sofreu alteração por efeito de cirurgia [ $p=0,3305$ ,  $F(1, 17) = 1,004$ ], do tratamento [ $p=0,9077$ ,  $F(1, 17) = 0,9077$ ] ou da associação dos fatores [ $p=0,4975$ ,  $F(1, 17) = 0,4806$ ]; (3) e, por fim, a expressão proteica de GSK-3 $\beta$  também não foi alterada por efeito de cirurgia [ $p=0,7045$ ,  $F(1, 16) = 0,1491$ ], do tratamento [ $p=0,3431$ ,  $F(1, 16) = 0,9545$ ] ou da associação dos fatores [ $p=0,6617$ ,  $F(1, 16) = 0,1987$ ].

Para quantificar o efeito da fosforilação total da GSK-3 no estriado, foi detectada a expressão proteica de pGSK-3 ativa abrangendo as isoformas pGSK-3 $\alpha$  (Y279) e pGSK-3 $\beta$  (Y216). Posteriormente quantificamos a expressão individual de pGSK-3 $\alpha$  (Y279) e de pGSK-3 $\beta$  (Y216) normalizadas pelo GAPDH. Assim podemos observar se as enzimas fosforilada ativa total e fosforiladas individualmente na sua conformação ativa, exerceriam um efeito significativo em relação ao modelo de DP e ao tratamento com LiCl na região do estriado.

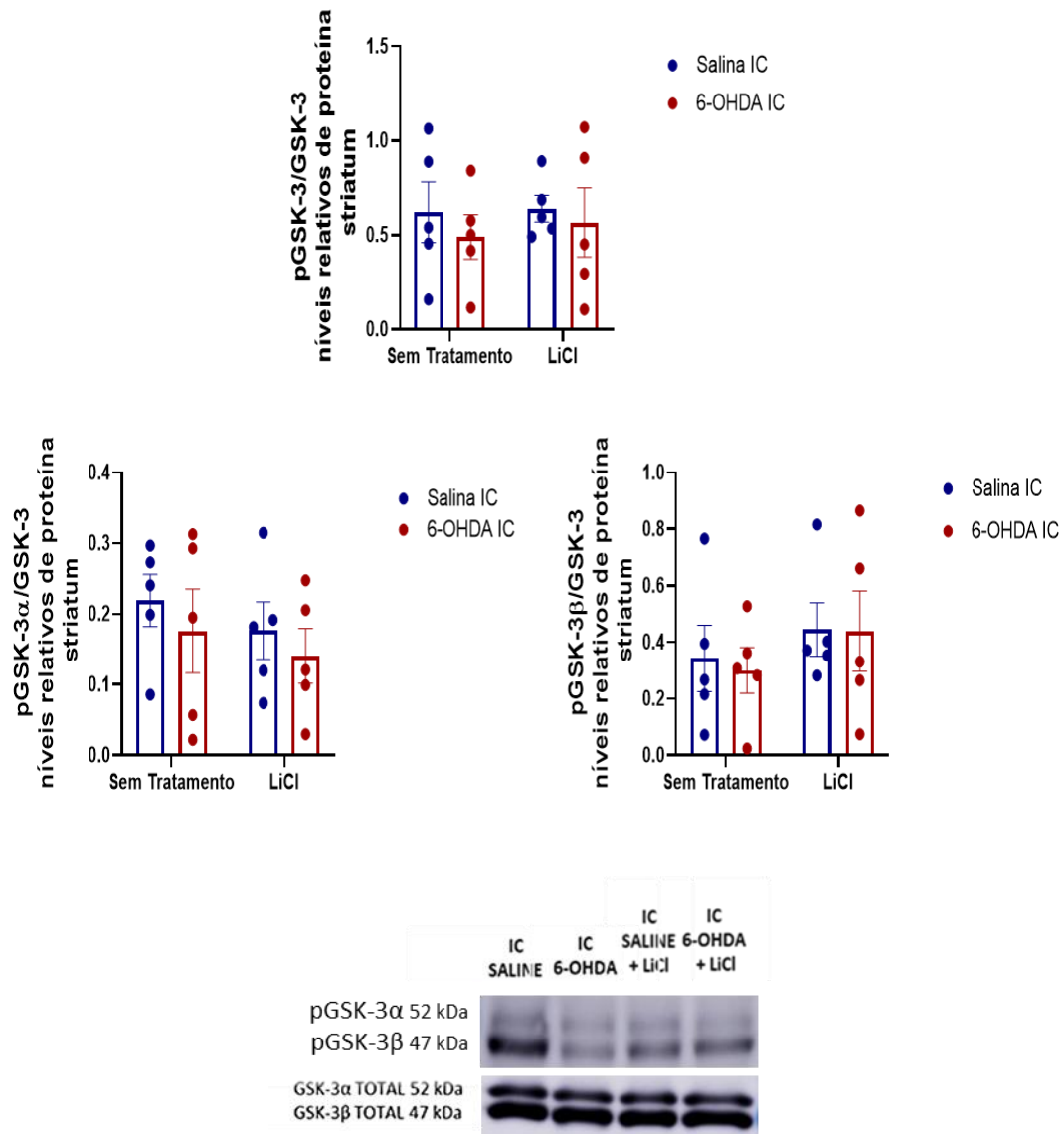




**Figura 16** - Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$  e pGSK-3 $\beta$  normalizadas por GAPDH no hemisfério experimental nas regiões do estriado (striatum) por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Por sua vez, a Figura 16 nos aponta, após a análise estatística por Two-way ANOVA, que não houve diferença estatisticamente significativa na expressão proteica da pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$  e pGSK-3 $\beta$  por efeito da cirurgia {[ $p=0,49$ ,  $F(1, 17) = 0,4979$ ], [ $p=0,3305$ ,  $F(1, 17) = 1,004$ ] e [ $p=0,7618$ ,  $F(1, 16) = 0,0951$ ], respectivamente}, do tratamento {[ $p=0,3114$ ,  $F(1, 17) = 1,089$ ], [ $p=0,9077$ ,  $F(1, 17) = 0,01386$ ] e [ $p=0,2188$ ,  $F(1, 16) = 1,638$ ], respectivamente} nem da interação entre os fatores {[ $p=0,37$ ,  $F(1, 17) = 0,848$ ], [ $p=0,4975$ ,  $F(1, 17) = 0,4975$ ] e [ $p=0,4548$ ,  $F(1, 16) = 0,4548$ ], respectivamente}.

Visando avaliar o efeito da fosforilação de GSK-3 em relação a expressão de GSK-3 total no estriado, realizamos a expressão proteica de pGSK-3 e das isoformas individuais da pGSK-3 $\alpha$  (Y279) e pGSK-3 $\beta$  (Y216) normalizadas pela GSK-3. Dessa forma podemos observar a atividade da enzima fosforilada em relação a GSK-3 total no modelo de DP e após o tratamento com LiCl na região do estriado.

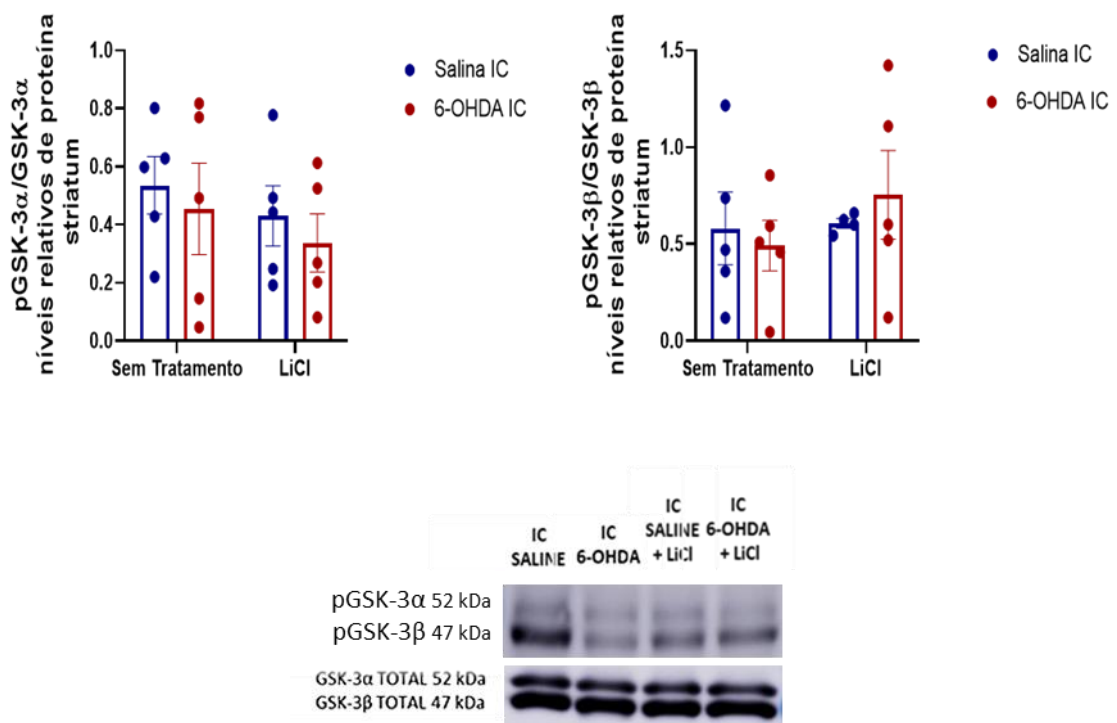


**Figura 17** - Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$  e pGSK-3 $\beta$  normalizadas por GSK-3 no hemisfério experimental direito do estriado (striatum) por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 4-5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Segundo a Figura 17, é possível observar que, quando avaliada a proporção de fosforilação da GSK-3 (pGSK-3/GSK-3 Total), não há diferença estatística quanto a efeito de cirurgia [ $p = 0,4755$ ,  $F(1, 16) = 0,534$ ], tratamento [ $p = 0,7381$ ,  $F(1, 16) = 0,1158$ ] ou interação de

fatores [ $p=0,8404$ ,  $F(1, 16) = 0,04191$ ]. A proporção de GSK-3 $\alpha$  fosforilada em Y216 em relação à expressão total de GSK-3 (pGSK-3 $\alpha$ /GSK-3 Total), após análise estatística, aponta para não existência de diferença nas médias encontradas quando avaliados efeito de cirurgia, tratamento ou interação {[ $p=0,2464$ ,  $F(1, 16) = 1,448$ ], [ $p=0,2307$ ,  $F(1, 16) = 1,553$ ], [ $p=0,9026$ ,  $F(1, 16) = 0,01547$ ], respectivamente}. Por fim, também não é encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação dos fatores cirurgia [ $p=0,9872$ ,  $F(1, 12) = 0,0002695$ ], tratamento [ $p=0,9914$ ,  $F(1, 12) = 0,0001206$ ] nem interação [ $p=0,6887$ ,  $F(1, 12) = 0,1685$ ] nos dados relativos à razão entre a fosforilação em Y216 da GSK-3 $\beta$  e a GSK-3 total (pGSK-3 $\beta$ /GSK-3 Total).

Por fim, avaliamos o efeito da fosforilação da pGSK-3 $\alpha$  (Y279) em relação a GSK-3 $\alpha$  total e da pGSK-3 $\beta$  (Y216) em relação a GSK-3 $\beta$  total. Dessa forma podemos identificar o quanto a conformação ativa da enzima reflete na atividade total destas quinases no modelo de DP e após o tratamento com LiCl na região do estriado.



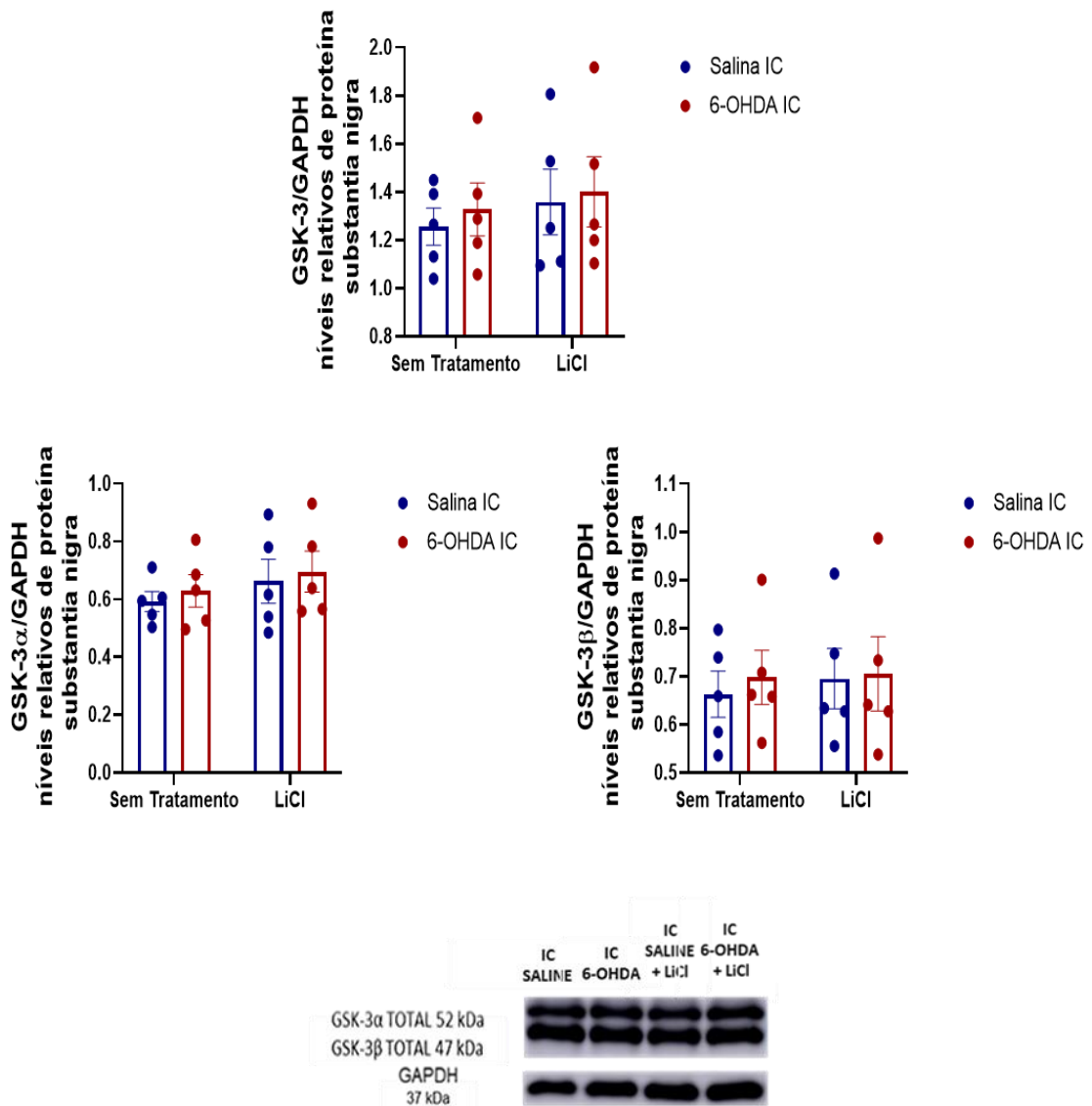
**Figura 18** – Análise da expressão de pGSK-3 $\alpha$  normalizadas por GSK-3 $\alpha$  e pGSK-3 $\beta$  normalizadas por GSK-3 $\beta$  no hemisfério experimental direito do estriado (striatum) por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 4-5 animais em cada grupo. A

diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Segundo a Figura 18, é visto que não foi encontrada diferença estatística nos fatores cirurgia, tratamento e interação quando avaliada a proporção de fosforilação de GSK-3 $\alpha$  (pGSK-3 $\alpha$ /GSK-3 $\alpha$ ) {[p=0,4701, F (1, 16) = 0,5474], [p=0,3599, F (1, 16) = 0,8883], [p=0,9619, F (1, 16) = 0,002355], respectivamente} nem de GSK-3 $\beta$  (pGSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$ ) {[p=0,8666, F (1, 15) = 0,02922], [p=0,4154, F (1, 16) = 0,7015], [p=0,5059, F (1, 16) = 0,4645], respectivamente}.

### **6.7 Análise da expressão proteica GSK-3, GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$ , pGSK-3 $\alpha$ (Y279) e pGSK-3 $\beta$ (Y216) na substância negra:**

Para quantificar o efeito da GSK-3 na SN, calculamos a expressão total da enzima GSK-3 e em seguida quantificamos individualmente a expressão de GSK-3 $\alpha$ , GSK-3 $\beta$  normalizadas pelo GAPDH. Assim podemos constatar se as enzimas totais (não fosforiladas) exerciam efeito significativo em relação ao modelo de DP e ao tratamento na região da SN.

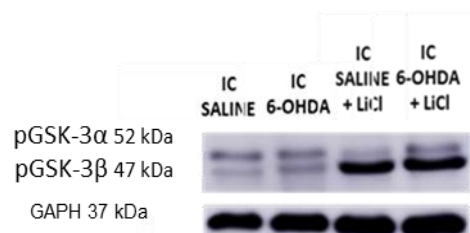
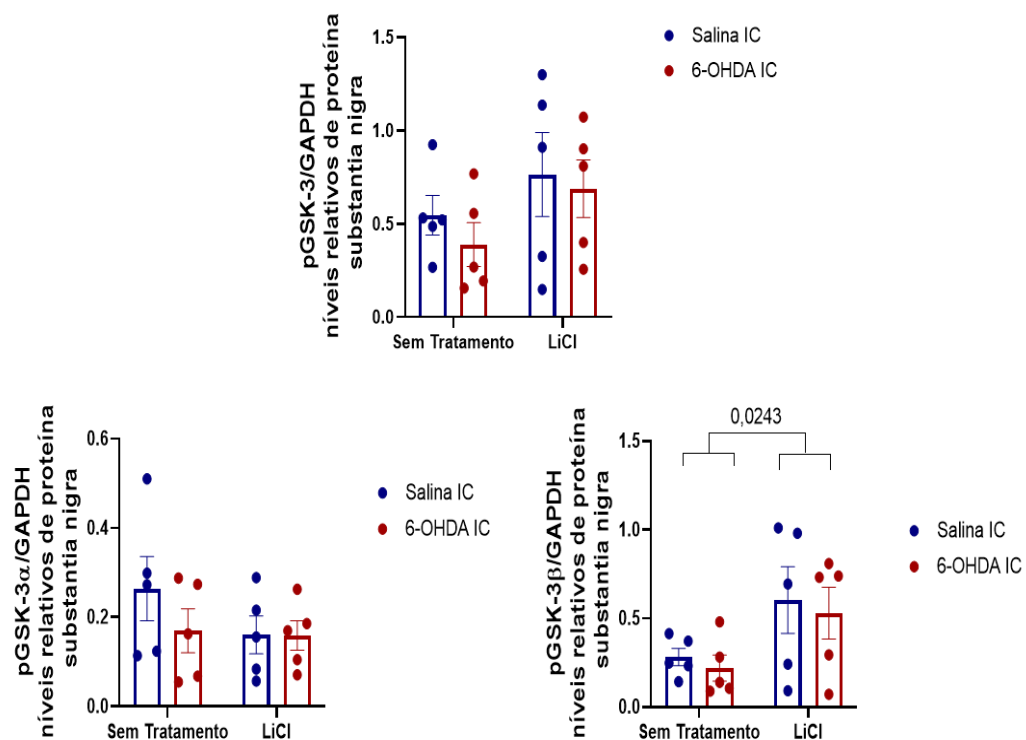


**Figura 19** – Análise da expressão de GSK-3, GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  normalizadas por GAPDH na substância negra (substantia nigra) por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Quando comparados os dados expostos na Figura 19, não foi encontrada diferença significativa na expressão de GSK-3 na substância negra quando avaliado o efeito da cirurgia [ $p = 0,6407$ ,  $F(1, 16) = 0,2263$ ], do tratamento [ $p = 0,4744$ ,  $F(1, 16) = 0,5366$ ] ou da interação entre os fatores [ $p = 0,904$ ,  $F(1, 16) = 0,01501$ ]. Ainda, quando a expressão da GSK-3 $\alpha$ , também não foi encontrada diferença estatística na avaliação do efeito da cirurgia [ $p = 0,58$ ,  $F(1, 16) =$

0,3192], tratamento [p=0,2838, F (1, 16) = 1,23] e interação [p=0,9724, F (1, 16) = 0,001231]. Por fim, como os resultados anteriores, a expressão proteica da GSK-3 $\beta$  no estriado também não apresentou diferenças significativas devido à cirurgia [p=0,7215, F (1, 16) = 0,1316], ao tratamento [p=0,7533, F (1, 16) = 0,1022] nem à interação [p=0,8411, F (1, 16) = 0,01=415].

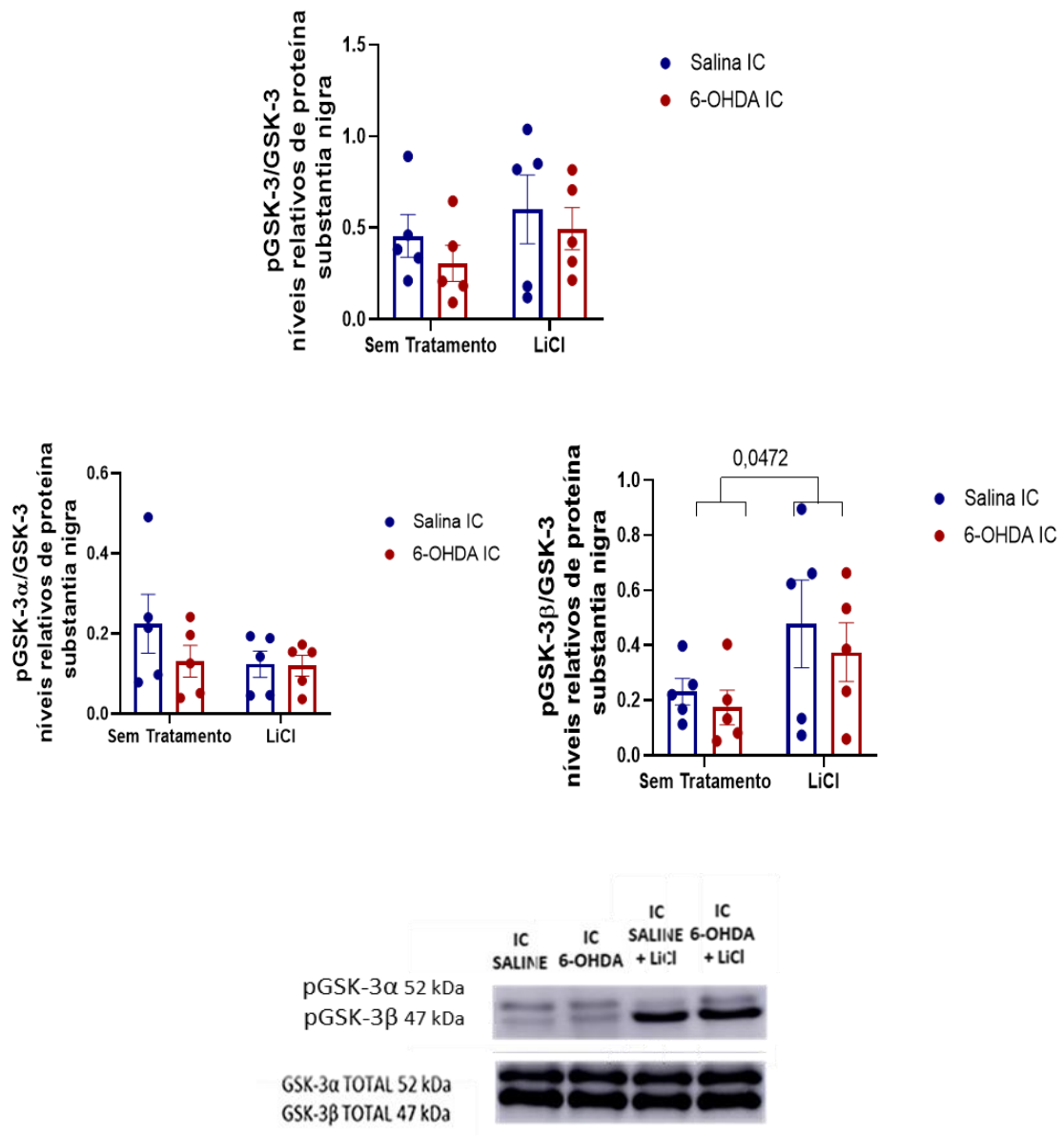
Para avaliar o efeito da fosforilação total da GSK-3 na região da SN, quantificamos a expressão proteica de pGSK-3 ativa, abrangendo as isoformas de pGSK-3 $\alpha$  (Y279), pGSK-3 $\beta$  (Y216). Logo após, quantificamos separadamente a expressão de pGSK-3 $\alpha$  (Y279) e de pGSK-3 $\beta$  (Y216) normalizadas pelo GAPDH. Assim podemos observar se as enzimas fosforilada ativa total e fosforiladas individualmente na sua conformação ativa exerceriam um efeito significativo em relação ao modelo de DP e ao tratamento com LiCl na região da SN.



**Figura 20** – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$  e pGSK-3 $\beta$  normalizadas por GAPDH na substância negra (substantia nigra) direita por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Os dados provenientes da Figura 20 apontam, após análise estatística, que na substância negra a quantidade absoluta de pGSK-3 normalizada pelo GAPDH (pGSK-3/GAPDH) não é estatisticamente diferente quando avaliado efeito de cirurgia, tratamento ou interação de fatores {[ $p=0,4704$ ,  $F(1, 16) = 0,5467$ ], [ $p=0,1209$ ,  $F(1, 16) = 2,684$ ], [ $p=0,7995$ ,  $F(1, 16) = 0,06671$ ], respectivamente}. Também não se apresentam estatisticamente diferentes as diferenças por cirurgia [ $p=0,3645$ ,  $F(1, 16) = 0,8712$ ], tratamento [ $p=0,2824$ ,  $F(1, 16) = 1,238$ ] ou interação entre os fatores [ $p=0,3783$ ,  $F(1, 16) = 0,8210$ ] na expressão absoluta de pGSK-3 $\alpha$  normalizada pela expressão de GAPDH (pGSK-3 $\alpha$ /GAPDH). Por fim, a expressão absoluta de pGSK-3 $\beta$  normalizada pela expressão de GAPDH não demonstrou alterações estatisticamente significativas no efeito de cirurgia ou interação {[ $p=0,5967$ ,  $F(1, 16) = 0,2915$ ] e [ $p=0,9654$ ,  $F(1, 16) = 0,001942$ ], respectivamente}, porém, foi encontrado aumento estatisticamente significativo da expressão de pGSK-3 $\beta$  devido ao tratamento [ $p=0,0243$ ,  $F(1, 16) = 6,185$ ].

Visando avaliar o efeito da fosforilação de GSK-3 em relação a expressão de GSK-3 total na SN, quantificamos a expressão proteica de pGSK-3 e de suas isoformas individuais pGSK-3 $\alpha$  (Y279) e pGSK-3 $\beta$  (Y216) normalizadas pela GSK-3. Dessa forma observamos a atividade da enzima fosforilada em relação a GSK-3 total no modelo de DP e após o tratamento com LiCl na região da SN.



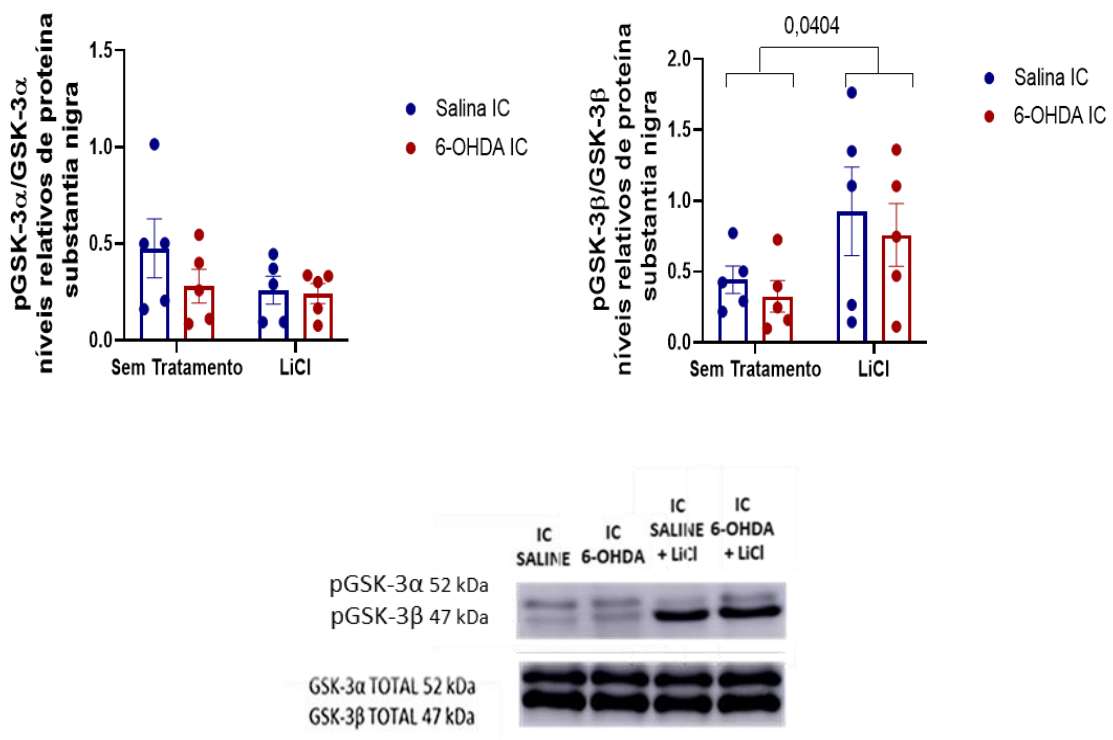
**Figura 21** – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3α e pGSK-3β normalizadas por GSK-3 na substância nigra (substantia nigra) direita por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Como é possível analisar na Figura 21, a proporção de GSK-3 que foi fosforilada (pGSK-3/GSK-3 Total) não apresentou diferença estatística nas médias oriunda da cirurgia, do tratamento ou da interação entre os fatores {[ $p=0,3536$ ,  $F(1, 16) = 0,9127$ ], [ $p=0,2296$ ,  $F(1, 16) = 1,561$ ] e [ $p=0,8712$ ,  $F(1, 16) = 0,02717$ ]}. Ainda, a proporção de pGSK-3α e pGSK-3β



(pGSK-3 $\alpha$ /GSK-3 Total e pGSK-3 $\beta$ /GSK-3 Total, respectivamente), também não apresentaram diferença estatística quanto à cirurgia {[p=0,3158, F (1, 16) = 1,073] e [p=0,4544, F (1, 16) = 0,5879]} e à interação {[p=0,3499, F (1, 16) = 0,9272] e [p=0,8299, F (1, 16) = 0,04769]}, porém, considerando o tratamento, enquanto que pGSK-3 $\alpha$ /GSK-3 Total não apresentou diferença [p=0,2483, F (1, 16) = 1,436], pGSK-3 $\beta$ /GSK-3 mostrou um aumento estatisticamente significativo nos animais que receberam LiCl IP quando comparados aos animais que não receberam este mesmo tratamento [p=0,0472, F (1, 16) = 4,623].

Finalmente, avaliamos atividade da GSK-3 $\alpha$  e da GSK-3 $\beta$  após a fosforilação em pGSK-3 $\alpha$  (Y279) normalizada pela GSK-3 $\alpha$  total e da pGSK-3 $\beta$  (Y216) normalizada pela GSK-3 $\beta$  total. Dessa forma podemos identificar o quanto a conformação ativa da enzima influencia na atividade total destas quinases no modelo de DP e após o tratamento com LiCl na região da SN.



**Figura 22** – Análise da expressão de pGSK-3 $\alpha$  normalizadas por GSK-3 $\alpha$  e pGSK-3 $\beta$  normalizadas por GSK-3 $\beta$  na substância nigra (substantia nigra) direita por *immunoblotting*. A revelação foi realizada em foto documentador Amersham Imager 600 (GE Healthcare) e quantificada utilizando o software ImageJ (National Institute of Mental

Health). Os dados foram expressos como média  $\pm$  EPM de 5 animais em cada grupo. A diferença foi considerada significativa quando  $p < 0,05$ . Para as análises estatísticas foi utilizado o programa de análise GraphPad Prism Version 8.2.1.

Os dados que originaram a Figura 22, por sua vez, apontam que não há diferença por cirurgia, tratamento ou interação na de expressão da porção fosforilada da GSK-3 $\alpha$  (pGSK-3 $\alpha$ /GSK-3 $\alpha$ ) {[p=0,2938, F (1, 16) = 1,178], [p=0,2131, F (1, 16) = 1,682] e [p=0,3770, F (1, 16) = 0,8256], respectivamente}. Porém, quanto à expressão da porção fosforilada de GSK-3 $\beta$  (pGSK-3 $\beta$ /GSK-3 $\beta$ ), mesmo não havendo alteração devido à cirurgia [p= 0,5004, F (1, 16) = 0,4754] ou à interação [p=0,9032, F (1, 16) = 0,01525], houve aumento desta porção por efeito do tratamento com LiCl IP [p=0,0404, F (1, 16) = 4,973].

## 7 DISCUSSÕES

A DP é uma doença complexa, de origem multifatorial, cujos os mecanismos fisiopatológicos ainda não foram elucidados por completo (PUSPITA; CHUNG; SHIM, 2017; GUO et al., 2018). Além disso, a elevação na taxa da expectativa de vida população mundial, acrescida do aumento no número de casos de DP, tornam essa patologia altamente relevante. Contudo, embora existam muitos avanços no estudo da DP, o atual panorama desta afecção é composto por tratamentos que promovem inúmeros efeitos adversos indesejáveis, terapias pouco eficazes quando há presença de sintomas resistentes à levodopa e a inexistência de uma cura ou efetiva estagnação da DP (ELKOUZI et al., 2019). Objetivando poupar gastos futuros com terapias de resultados limitados, surge uma notável inquietação em torno de buscas de alternativas inovadoras que envolvam o diagnóstico e intervenções precoces da morte neuronal da DP. Neste contexto, o presente trabalho se demonstra pertinente, pois propôs quantificar o efeito do cloreto de lítio (LiCl) que é um fármaco cotado como uma possível estratégia terapêutica para a DP, nos neurônios dopaminérgicos da SN e no estriado. Além disso, avaliamos a influência da enzima GSK-3 $\beta$  e de suas vias moduladoras na morte dos neurônios dopaminérgicos no modelo de DP e no tratamento com LiCl.

Para o estudo dos mecanismos que medeiam a morte dos neurônios dopaminérgicos situados na região do mesencéfalo, nós utilizamos como estratégia modificadora, o modelo de lesão induzida pela administração de 6-OHDA intracerebral. A escolha do uso da injeção de 6-OHDA no estriado é devido a confiabilidade da técnica e da sua relação íntima com a perda de neurônios dopaminérgicos na SN (BAGGA; DUNNETT; FRICKER, 2015). Para reproduzir o modelo de DP, optamos pelo método da administração de 6-OHDA intracerebral unilateral. Heuer e colaboradores demonstraram que em animais submetidos a injeção unilateral de 6-OHDA intracerebral, após a administração da apomorfina (um agonista dopaminérgico), apresentaram significativamente mais rotações contralaterais quando comparados ao grupo controle (HEUER et al., 2012). Depois da escolha da neurotoxina e das coordenadas estereotáxicas, coletamos as amostras de tecido 15 dias após o procedimento cirúrgico e visualizamos que o efeito da veiculação de 6-OHDA na região da SN de camundongos C57BL/6J, gera uma redução estatisticamente significativa na expressão de mRNA de TH dos animais em que se administrou 6-OHDA IC, quando comparados aos animais pertencentes ao grupo que recebeu Salina IC nas mesmas coordenadas estereotáxicas (Figura 12). Além disso, também observamos uma redução

estatisticamente significativa na expressão de mRNA de TH entre os grupos 6-OHDA (tratados e não tratados com LiCl IP) em comparação aos animais Salina IC (tratados e não tratados com LiCl IP) (Figura 12). Estes resultados estão em concordância com o que vimos através da técnica de imuno-histoquímica (Figura 7) e em conjunto, estas metodologias comprovam que o nosso modelo de DP pela administração de 6-OHDA intracerebral unilateral, exhibe os mesmos aspectos da lesão nos neurônios dopaminérgicos da SN, padronizada por Chen e colaboradores nestas mesmas coordenadas estereotáxicas (CHEN et al., 2017a). Além disso, quando se trata do quesito expressão gênica, os atuais achados encontrados por nós corroboram com o que foi visto por Kastner et.al e Chen et.al, em pacientes com DP ou em ratos submetidos ao modelo de DP. Estes trabalhos citados demonstraram que ocorre uma redução significativa no conteúdo de mRNA de TH em neurônios da SN (quando comparados ao grupo controle) (KASTNER et al., 1993; CHEN et al., 2017b). Em termos gerais, o uso da 6-OHDA intracerebral conseguiu interferir na expressão gênica da TH, reduzindo a biossíntese da dopamina e caracterizando o aspecto da morte neuronal na dopaminérgica na SN (Figura 7).

Apesar de ser notável a redução na expressão de TH na região da SN, o mecanismo de morte neuronal ativado após a administração de 6-OHDA intracerebral ainda não foi completamente elucidado. Contudo existem relatos de que a administração de 6-OHDA promove a ativação da apoptose intrínseca através do aumento da liberação do citocromo C da mitocôndria e da ativação de caspases (Caspase-9 e Caspase-3) (SHRIVASTAVA et al., 2013). De forma complementar, Kerr e colaboradores observaram que camundongos transgênicos que superexpressavam a Caspase-3 humana eram mais susceptíveis aos insultos neurodegenerativos (KERR et al., 2004). Assim, muitos trabalhos de DP passaram a avaliar a atividade das Caspases na degeneração dos neurônios dopaminérgicos, principalmente da Caspase-3 que é a iniciadora central da apoptose neuronal. Levando em conta a relevância da quantificação da apoptose e o fato da transcrição do gene da Caspase-3 ter sido caracterizado como um marcador de toxicidade neuronal (FOLCH et al., 2010), nós avaliamos a expressão de mRNA de Caspase-3 na SN (Figura 13 F) dos grupos experimentais aqui propostos e os resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa na expressão de mRNA de Caspase-3 entre aos animais 6-OHDA (tratados e não tratados com LiCl), quando comparados aos animais pertencentes aos grupos Salina IC (tratados e não tratados com LiCl). Este achado pode ser indicativo de que a morte neuronal induzida pelo modelo de 6-OHDA na região do mesencéfalo, está relacionada com o

aumento da expressão gênica de Caspase-3, assim como foi demonstrado pela expressão proteica da Caspase-3 clivada em outros modelos de DP (LI et al., 2017). Apesar disso, não encontramos um aumento significativo na expressão gênica de Caspase-3 nos animais pertencentes ao grupo 6-OHDA IC, em relação ao grupo controle (Salina IC) como visualizado por Liu e colaboradores em um modelo de DP com 12 µg de 6-OHDA, injetada unilateralmente na VTA direita da SN do rato (LIU; ZHANG; YANG, 2018), bem como também foi visto por Kesh e Kannan em um modelo de zebra-fish induzido por 6-OHDA (YOON; MONCHI, 2021b). Apesar do uso da neurotoxina 6-OHDA ter sido igual ao dos artigos citados, a lesão intraestriatal pode ter desenvolvido a morte neuronal por outros mecanismos que serão melhor explanados neste trabalho. Apesar disso, mesmo que o dado encontrado pela nossa equipe não tenha apresentado uma diferença estatística significativa, quando se observa o gráfico de mRNA da Caspase-3 na SN (Figura 13 F) percebe-se uma tendência de aumento da expressão deste gene apoptótico nos animais 6-OHDA IC em relação ao grupo controle. Uma possível explicação para este fato está no aumento mais pronunciado da atividade de Caspase-3 clivada ocorrer nas fases iniciais da lesão (especificamente no 3º dia após a injeção de 6-OHDA) e que apresenta uma tendência redutora no 15º dia após a lesão, provavelmente em decorrência da menor expressão de mRNA de Caspase-3 nesta mesma data (HERNANDEZ-BALTAZAR; MENDOZA-GARRIDO; MARTINEZ-FONG, 2013).

Quanto a expressão de mRNA Caspase-3 no estriado (Figura 13 E), este sinalizador celular foi encontrado aumentado na região estriatal significativamente em estudos de animais com lesão de isquemia por reperfusão (obtida pela oclusão da artéria cerebral média por 2 horas) em relação ao grupo cirurgia simulada (LI et al., 2014b). Porém em um outro trabalho que utilizou o tratamento com da toxina mitocondrial ácido 3-nitropropiónico (3NP) durante 5 dias, verificou-se uma diminuição na expressão de Caspase-3 ativa na região do estriado de ratos, em comparação aos animais controle (BIZAT et al., 2003). Apesar de serem modelos distintos, tanto a 6-OHDA quanto o 3NP exercem neurotoxicidade por meio da inibição dos complexos mitocondriais (pelo menos em parte). Logo, o achado de Bizat e colaboradores foi consistente com o que foi encontrado por nós, pois mostramos uma redução na expressão gênica da Caspase-3 nos animais que receberam a neurotoxina 6-OHDA IC (tratados e não tratados com LiCl), quando comparados aos animais pertencentes aos grupos Salina IC (tratados e não tratados com LiCl). Acredita-se que isto tenha ocorrido em consenso com o surgimento de evidências indicativas de que uma única injeção intraestriatal de 6-OHDA, promova a ativação local

no estriado da microglia que produz por sua vez ROS e em seguida estes radicais desemparelhados podem adentrar os terminais do corpo estriado, sendo posteriormente transportados para o corpo celular na SNpc. Na região da SNpc, os radicais livres causam danos ao DNA e ativam a sinalização apoptótica via p53-Bax-Caspase-3 clivada, promovendo assim, a morte neuronal (LI et al., 2012). Estes mecanismos neurotóxicos possivelmente determinam a distinção entre a ativação das vias de morte nos neurônios dopaminérgicos situados entre as regiões do estriado e da SN em relação a expressão de mRNA de Caspase-3, bem como a expressão proteica ativa desta enzima.

Após a validação do modelo de DP e o estudo da correlação da Caspase-3 com a 6-OHDA, demos continuidade ao desenho experimental através da realização da metodologia de imunofluorescência visando a expressão de TH no período de 24 horas após a injeção de 6-OHDA (Figura 8 e Figura 9). Como resultado, nós constatamos que neste intervalo de tempo a injeção intraestriatal de 6-OHDA unilateral, foi capaz de induzir a lesão retrógrada dos neurônios dopaminérgicos situados na região direita da SNpc e atingiu também, parte da área VTA situada no mesmo hemisfério cerebral. Estes achados corroboram com o que foi encontrado por Capitelli et.al, e Yong et.al., onde o modelo de DP empregado, induziu uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos (TH<sup>+</sup>) na SNpc, no mesmo intervalo de 24 horas após administração da 6-OHDA (CAPITELLI et al., 2008; YONG et al., 2011). Além disso, tem-se respaldos na literatura de que a morte neuronal na SNpc pode ser iniciada nas primeiras 12 horas após uma única injeção de 6-OHDA (BLANDINI; ARMENTERO, 2012). Dessa forma, os dados encontrados por nossa equipe e pelos trabalhos mencionados, demonstram que a lesão induzida nos neurônios dopaminérgicos da SN, já havia sido instaurada antes da veiculação intraperitoneal do LiCl que foi iniciada 24 horas após o procedimento cirúrgico. Todavia uma melhor compreensão do efeito modulador do LiCl aconteceu após a quantificação da lesão na SN através da expressão gênica de TH dos animais que receberam Salina IC e dos animais com a DP induzida por 6-OHDA, que foram tratados em comparação aos que não foram tratados com LiCl.

Embora a hipótese do efeito neuroprotetor do lítio tenha um embasamento sólido na literatura, poucos trabalhos estudaram o efeito do tratamento com lítio *in vivo* visando o estudo dos grupos de neurônios dopaminérgicos na SN e de suas projeções que atingem o núcleo estriado em animais saudáveis ou em modelos de DP. Dentre os escassos estudos que avaliaram o efeito modulador do lítio *in vivo* na região da SN, pode ser mencionado o artigo de Qi e

colaboradores, onde a associação do LiCl aumentou a proliferação de células-tronco neurais, estimulou a diferenciação de neurônios dopaminérgicos, melhorou a função motora, otimizou o aprendizado e a memória em ratos submetidos ao modelo de DP induzido por 6-OHDA (QI et al., 2017). Entretanto, ainda que o lítio tenha demonstrado efeito sinérgico no aumento da geração de novos neurônios dopaminérgicos mediado por laminina, heparina e bFGF, neste trabalho não foi avaliada a expressão da enzima TH. Contudo, ao avaliarmos a expressão de TH na SN, encontramos um resultado contrastante, pois observamos que os animais tratados com o LiCl, tanto pertencentes ao grupo Salina IC quanto ao grupo 6-OHDA IC, apresentaram uma redução na expressão gênica de TH em relação ao grupo controle (Salina IC) que não recebeu o tratamento de LiCl. A mesma redução estatisticamente significativa ocorreu entre os animais Salina IC e 6-OHDA IC (tratados com LiCl) quando comparados aos animais Salina IC e 6-OHDA (não tratados com LiCl) (Figura 12). Ou seja, estes dados são sugestivos de que a morte dopaminérgica na SN foi proveniente do tratamento com o LiCl e não somente do modelo de 6-OHDA. Logo, os nossos resultados estão em concordância com o que foi visto por Wu e colaboradores, onde a administração intraperitoneal de LiCl em ratos pelo período de 17 dias, reduziu a expressão de células TH<sup>+</sup> na SN quando comparadas ao grupo controle. Porém, ainda no trabalho de Wu e colaboradores, o tratamento com LiCl matou menos células TH<sup>+</sup> que o modelo de DP induzido por 6-OHDA (WU et al., 2018). Este resultado pode estar relacionado com a concentração veiculada de LiCl IP que foi de 1 mEq/kg (em torno de 42,394 mg/kg). No nosso trabalho, utilizamos 4 mmol/kg (em torno de 170 mg/kg) pois foi demonstrado que esta concentração é capaz de inibir a enzima GSK-3 $\beta$  em camundongos (YUSKAITIS et al., 2010) e que foi comprovada por nós a partir da redução da expressão de mRNA de GSK-3 $\beta$  em nossos resultados (Figura 13 D). Apesar disso, a dose de 4 mmol/kg aparenta ter gerado uma morte mais violenta do que a dose de 1 mEq/kg utilizada por Wu e colaboradores. Dessa forma, não detectamos uma variação significativa na expressão gênica de TH entre os animais que receberam Salina IC e que foram tratados com LiCl em relação aos animais 6-OHDA que não receberam tratamento de LiCl. Este achado reflete que o padrão de morte neuronal relacionado a expressão gênica de TH, foi estatisticamente igual entre estes grupos. E o mesmo fato ocorreu em relação ao grupo 6-OHDA IC que recebeu o LiCl, quando comparado ao grupo 6-OHDA IC que não recebeu o tratamento com LiCl, neste caso, a ausência de uma diferença significativa entre os grupos provavelmente ocorreu pela lesão induzida pela 6-OHDA, por si só, ter induzido

a morte neuronal abrupta como mencionada nos parágrafos anteriores, de forma que não apresentou uma variação para a morte dopaminérgica induzida pelo LiCl.

Em geral a neurotoxicidade induzida pela administração de lítio ocorre em grandes dosagens, mas desde 1983, Donaldson e Cuningham apresentaram relatos de caso que a toxicidade pode acontecer até mesmo em doses terapêuticas (DONALDSON; CUNINGHAM, 1983). Sendo assim, existe uma problemática envolvida no uso do lítio crônico como tratamento para a DP, pois este fármaco apresenta a dose letal próxima do índice terapêutico, desenvolvendo alguns efeitos colaterais, como, por exemplo, a diminuição da expressão de TH na SN, observada por nós (Figura 12) e que também foi encontrada por Lei e colaboradores, em um estudo realizado em camundongos B16/C57J machos de 3 meses de idade, tratados com LiCl via oral durante 21 dias. O objetivo deste estudo era entender os efeitos adversos do uso do LiCl crônico, em especial do tremor de mão do tipo Parkinson. Os resultados mostraram que o LiCl promoveu a neurodegeneração na SN em doses terapêuticas por um mecanismo relacionado com a redução nos níveis de tau solúvel no cérebro, aumento na taxa de ferro nigral e cortical que contribuiram com o prejuízo motor/cognitivo dos animais. Em vista disso as descobertas encontradas por nós e que estão em concordância com estes pesquisadores desafiam o uso do lítio como um possível tratamento para DP (LEI et al., 2017). Porém dado a relevância deste tema e a ausência de outros compostos efetivamente neuroprotetores que possam ser usados em indivíduos acometidos pela DP ou por outras doenças neurodegenerativas, tem-se considerado o lítio como uma estratégia terapêutica para a DP (DAMRI; SHEMESH; AGAM, 2020). Em vista disso, existe atualmente um ensaio clínico randomizado em indivíduos com Parkinson que estão sendo tratados com lítio (dados ainda não publicados). Neste estudo estão sendo utilizadas 3 dosagens de lítio, em 18 pacientes com DP por um período de 6 meses. Este ensaio foi patrocinado pela University at Buffalo e contribuirá para um melhor entendimento do efeito modulador deste fármaco *in vivo* (“Effects of Lithium Therapy on Blood-based Therapeutic Targets in Parkinson’s Disease. - Full Text View - ClinicalTrials.gov”).

Apesar de termos demonstrado neste trabalho que o LiCl promoveu a redução da expressão de mRNA de TH na SN, o mecanismo pelo qual ocorra este fato parece não estar relacionado com a expressão gênica de Caspase-3 (Figura 13 F), como ocorrido no caso da veiculação da neurotoxina 6-OHDA. Nós chegamos a esta conclusão, a partir da observação de que os animais pertencentes ao grupo que recebeu LiCl apresentaram uma menor expressão da Caspase-3 quando comparados aos animais que não receberam LiCl. Este achado foi novamente verificado



depois da aplicação do pós-teste de Bonferroni, onde os animais que receberam Salina IC e que foram tratados com LiCl apresentam uma menor expressão da Caspase-3 em relação aos animais que receberam 6-OHDA IC e não receberam LiCl. Sendo assim, estes resultados deram margem a investigação de outros mecanismos de morte neuronal dopaminérgica ainda no modelo de DP ou pelo tratamento com LiCl. E a partir de estudos prévios que evidenciaram que o lítio apresenta efeitos mediados pela via de sinalização AKT/GSK-3 $\beta$  (MEHRAFZA et al., 2019) e que a enzima pró-apoptótica GSK-3 $\beta$  pode ser ativada em neurônios dopaminérgicos da SN após a injeção estriatal de 6-OHDA (HERNANDEZ-BALTAZAR; MENDOZA-GARRIDO; MARTINEZ-FONG, 2013), resolvemos estudar os possíveis efeitos moduladores do LiCl e da 6-OHDA na neurodegeneração dopaminérgica a partir da via AKT/GSK-3 $\beta$ .

Aqui observamos que na região estriatal, tanto a enzima GSK-3 $\beta$  (Figura 13 C) quanto a AKT (Figura 13 A) não apontaram nenhuma diferença estatística em suas expressões de mRNA. Portanto, a expressão gênica da enzima GSK-3 $\beta$  e da AKT na região onde encontra-se situada a projeção dopaminérgica, não aparentam estar relacionadas com a morte neuronal induzida pela injeção de 6-OHDA nas concentrações e nas coordenadas estereotáxicas utilizadas por nós, assim como, o tratamento com LiCl não apresenta uma variação na expressão de mRNA de GSK-3 $\beta$  e da AKT entre os grupos experimentais. Porém em relação a expressão gênica de mRNA de GSK-3 $\beta$  na SN (Figura 13 D) não foi encontrada uma diferença significativa em relação ao modelo de DP. Todavia foi encontrada uma redução na expressão de mRNA de GSK-3 $\beta$  dos animais tratados com LiCl quando comparados com os animais que não receberam o tratamento. Este achado é sugestivo de que o efeito modulador do LiCl, amplamente mencionado em modificações pós-traducionais, tenha exercido aqui um efeito regulador negativo na expressão gênica. Este mesmo efeito inibidor do LiCl na expressão mRNA de GSK-3 $\beta$ , foi visto por Mendes e colaboradores em um estudo de cultura primária de neurônios do hipocampo, onde a expressão de GSK-3 $\beta$  estava diminuída após o tratamento com uma dose de 2mM de LiCl. Além disso, este mesmo trabalho destacou que houve uma redução significativa nos níveis de mRNA de GSK-3 $\beta$  no hipocampo de ratos, mas esta variação não foi encontrada no córtex e nem nos leucócitos periféricos dos ratos tratados com LiCl tratados. Estes resultado encontrado por Mendes e colaboradores é esclarecedor em relação ao efeito variável do LiCl na expressão de mRNA de GSK-3 $\beta$  de local para local no cérebro (MENDES et al., 2009). Aqui nós encontramos uma redução significativa na expressão gênica desta enzima na SN, todavia o

mesmo não ocorreu no estriado indicando um papel distinto desta glicogênio sintase quinase nas estruturas mencionadas.

No entanto, apesar do lítio ter regulado negativamente a expressão de mRNA de GSK-3 $\beta$ , ainda temos o achado antagônico deste mesmo composto promovendo a redução da expressão de mRNA de TH. Isso nos instigou avaliar nas etapas seguintes, o papel apoptótico da enzima GSK-3 e o efeito da suas isoformas na conformação ativa (pGSK-3 $\alpha$  (Y279) / pGSK-3 $\beta$  (Y216)) na SN e no Estriado.

No estriado não detectamos nenhuma variação estatisticamente significativa referente a expressão proteica de GSK-3, GSK-3 $\alpha$ , a GSK-3 $\beta$ , pGSK-3, pGSK-3 $\alpha$  e a pGSK-3 $\beta$  entre os grupos Salina IC, 6-OHDA IC, Salina IC tratados com LiCl, 6-OHDA IC tratados com LiCl (Figura 15, Figura 16 e Figura 17 e Figura 18), assim como foi demonstrado pela expressão gênica de GSK-3 $\beta$ . Estes dados são indicativos de que a enzima GSK-3 e pGSK-3 (Y216 e Y279) não tenham exercido influência no modelo de 6-OHDA, bem como no tratamento com LiCl, nesta região cerebral. No entanto, a enzima GSK-3 $\beta$  tem sido amplamente correlacionada com várias etapas envolvendo a sinalização celular em neurônios da SN, principalmente relacionada com a morte neuronal dopaminérgica (SONGIN et al., 2011; GOLPICH et al., 2015; GU et al., 2017). Sendo assim, resolvemos estudar a influência desta enzima na SN e com o auxílio da técnica de imunofluorescência, evidenciamos que a disposição da pGSK-3 (Y216 e Y279) na região do mesencéfalo de camundongos C57BL/6J, apresenta um padrão de dupla-marcação com a enzima TH. Estes achados são indicativos de que a enzima pGSK-3 encontra-se na conformação ativa no núcleo dos neurônios dopaminérgicos (Figura 10 e Figura 11), estando em consenso com o que foi encontrado por Baltazar e colaboradores (HERNANDEZ-BALTAZAR; MENDOZA-GARRIDO; MARTINEZ-FONG, 2013).

De forma complementar a estes resultados, nós quantificamos através da técnica de immunoblotting a atividade das isoformas da pGSK-3 ativa nos neurônios da SN e constatamos que após o tratamento com LiCl, ocorreu um aumento significativo da fosforilação da enzima GSK-3 $\beta$  (Y216), todavia o mesmo não ocorreu para a isoforma GSK-3 $\alpha$  na conformação ativa (Y279). Este resultado foi sugestivo de que as enzimas GSK-3 $\alpha$  e a GSK-3 $\beta$  apresentam efeitos diferenciais na região da SN e estão em conformidade com o que foi visto por Li e colaboradores, onde a GSK-3 $\beta$  contribuiu com a neurodegeneração dopaminérgica da SN e a GSK-3 $\alpha$  não (LI et al., 2020). Embora a GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  apresentem algumas funções sobrepostas devido a homologia no seu domínio catalítico, esta compensação não ocorre como via de regra. As

isoformas da GSK-3 possuem preferências variáveis aos seus ligantes de acordo com a afinidade estrutural e a disponibilidade da enzima no órgão em que estão localizadas. Um exemplo disso, foi evidenciado por Soutar e colaboradores que demonstraram que após a deleção individual de cada uma das isoformas da GSK-3 no cérebro, ocorre uma fosforilação preferencial a determinados substratos de acordo com a isoforma disponível, tendo uma ligação direta com o espectro de interação com os ligantes ser diferente entre a GSK-3 $\alpha$  e GSK-3 $\beta$  (SOUTAR et al., 2010).

Ainda em relação à expressão de GSK-3 $\beta$  (Y216), não encontramos nenhuma diferença significativa que estivesse ligada com a redução de mRNA de TH presente no nosso modelo de 6-OHDA. Provavelmente porque a 6-OHDA tenha induzido a morte neuronal, por outros mecanismos independentes ou dependentes minimamente de GSK-3 $\beta$  (Y216), pelo menos em relação a expressão desta enzima no 15º após a lesão. O resultado encontrado por nós corrobora com o que foi visto por Yong e colaboradores, trabalho no qual, o tratamento com lítio foi incapaz reduzir a neurodegeneração induzida por 6-OHDA na SN e a enzima GSK-3 aparentou estar minimamente relacionada com a neurodegeneração no modelo de 6-OHDA em rato (YONG et al., 2011).

Contudo, em relação ao possível mecanismo pelo qual ocorreu o aumento da fosforilação da GSK-3 $\beta$  (Y216) da SN (Figura 20, Figura 21 e Figura 22) dos animais que foram tratados com LiCl, podemos associar com a redução estatisticamente significativa que houve na expressão do mRNA de AKT em relação ao grupo controle (Figura 13 B). Este dado é indicativo de que o LiCl na concentração utilizada tenha exercido um mecanismo inibitório na expressão gênica da AKT. Nemoto e colaboradores observaram esta mesma atividade supressora do LiCl no estudo células de cromafins adrenais bovinas tratadas com este composto. Neste trabalho o LiCl diminuiu o nível de mRNA de Akt1 em 20% no período de 6 h após o tratamento, sugerindo que a inibição da GSK-3 $\beta$  causou a regulação negativa da AKT tanto a nível proteico quanto a nível de expressão gênica (NEMOTO et al., 2008). Ou seja, o efeito supressor do LiCl culminou em uma menor síntese de AKT disponível para exercer o seu mecanismo de fosforilação inibitória da enzima GSK-3 $\beta$  na posição Serina 9. A medida que a GSK-3 $\beta$  é sintetizada constitutivamente na forma ativa, a menor inibição gerada a partir da redução na disponibilidade de AKT pode ter promovido o aumento da expressão proteica de GSK-3 $\beta$  (Y216) da SN (KRISHNANKUTTY et al., 2017).

Acreditamos por fim, que o aumento da atividade GSK-3 $\beta$  (Y216) nos animais tratados com LiCl, tenha um mecanismo semelhante com o que foi proposto por Credle e colaboradores, onde a GSK-3 $\beta$  (Y216) ativou a transferência de um grupamento fosfato para a  $\alpha$ -Syn na posição serina 129, promovendo o dobramento, a agregação e o acúmulo de  $\alpha$ -Syn nos neurônios TH<sup>+</sup> da SN. Este fenômeno reduziu a produção de dopamina devido a alteração no tráfego de neurotransmissores e ativou mecanismos sinalizadores de morte nos neurônios TH<sup>+</sup> nesta região. De maneira complementar foi demonstrado neste mesmo estudo uma cooperação entre  $\alpha$ -Syn e a Tau para aumentar a fosforilação uma da outra por GSK-3 $\beta$  (Y216), comprometendo dessa forma as funções homeostáticas destas proteínas, enaltecendo o estresse oxidativo nigral (CREDLE et al., 2015). Além disso, a  $\alpha$ -Syn anômala pode interferir com a entrada de ferro no neurônio dopaminérgico comprometendo as funções na célula exercidas por esta proteína. Um dos mecanismos intracelulares regulados pela atividade da  $\alpha$ -Syn e que passa a ser afetado negativamente após a disfunção desta proteína, é a endocitose do receptor de transferrina ligado ao íon ferro e conduzido pela dinamina. A ausência da regulação pela  $\alpha$ -Syn promove a sinalização de outro mecanismo compensatório que permite entrada do íon ferro e utiliza o transportador de metal divalente 1 (DMT1), porém a regulação por esse caminho é menos eficaz e gera o acúmulo de ferro no interior do neurônio. Da mesma forma, a  $\alpha$ -Syn disfuncional vai interferir nas etapas do empacotamento da dopamina em vesículas sinápticas mediada por VMAT2 (possui um papel importantíssimo no mecanismo antioxidante) e também na ligação de VAMP2 a proteínas tSNARE na membrana pré-sináptica, que captam/recaptam dopamina das sinapses, mediadas pelo transportador de dopamina (DAT). E em repercussão, a dopamina livre situada no citoplasma neuronal sofre acúmulo e acentuação do metabolismo oxidativo à medida que além das espécies reativas de oxigênio (EROs), tem como subprodutos as dopamina-quinonas (DAQs) pelo mecanismo de Fenton. Além disso, o ferro acumulado interage com a dopamina livre, produzindo altas taxas de radicais desemparelhados que enfatizam o processo de neurodegeneração na SNpc (BIOSA et al., 2018; TRIST; HARE; DOUBLE, 2019). Em vista do que foi mencionado, o possível acúmulo de  $\alpha$ -Syn ocasionado pela atividade aumentada da GSK-3 $\beta$  (Y216), pode estar conectado com o que com o que foi visto por Lei e colaboradores, onde o aumento do ferro foi um fator determinantes para a neurodegeneração na SN após o tratamento com LiCl (LEI et al., 2012, 2017).

## 8 CONCLUSÃO

Nós constatamos a existência de um efeito antagônico do uso LiCl aumentando a taxa de fosforilação de GSK-3 $\beta$  (Y216) e que aparenta estar relacionado com a redução de mRNA de TH em neurônios dopaminérgicos da SN dos animais que foram tratados com este composto. Além disso, também observamos uma redução da expressão de mRNA de AKT nos animais tratados com lítio em relação ao grupo controle. Estes achados sugerem um potencial mecanismo pelo qual o uso de LiCl a longo prazo induz a neurotoxicidade dopaminérgica na região da SN e que promove os seus principais efeitos adversos que desafiam o uso de composto para o tratamento da DP.

## REFERÊNCIAS\*

AARSLAND, D. et al. Cognitive decline in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 4, p. 217–231, 3 abr. 2017.

ALAM, G.; RICHARDSON, J. R. Regulation of tyrosine hydroxylase: relevance to Parkinson's disease. In: 2 (Ed.). **Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease**. 1. ed. 3: Elsevier, 2020. p. 51–66.

ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548, 11 fev. 2020.

AYTON, S. et al. Parkinson's Disease Iron Deposition Caused by Nitric Oxide-Induced Loss of  $\alpha$ -Synuclein Precursor Protein. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 3591–3597, 25 fev. 2015.

BAGGA, V.; DUNNETT, S. B.; FRICKER, R. A. The 6-OHDA mouse model of Parkinson's disease – Terminal striatal lesions provide a superior measure of neuronal loss and replacement than median forebrain bundle lesions. **Behavioural Brain Research**, v. 288, p. 107–117, jul. 2015.

BAIRD-GUNNING, J. et al. Lithium Poisoning. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 32, n. 4, p. 249–263, 11 maio 2017.

BARRELL, W. B.; SZABO-ROGERS, H. L.; LIU, K. J. Novel Reporter Alleles of GSK-3 $\alpha$  and GSK-3 $\beta$ . **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e50422, 21 nov. 2012.

BAUTISTA, S. J. et al. mTOR complex 1 controls the nuclear localization and function of glycogen synthase kinase 3 $\beta$ . **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 38, p. 14723–14739, set. 2018.

BEAULIEU, J.-M. et al. Lithium antagonizes dopamine-dependent behaviors mediated by an AKT/glycogen synthase kinase 3 signaling cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 5099–5104, 6 abr. 2004.

\*De acordo com: ASOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NRB 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro. 2002. 24p.

BECKER, B. et al. Effect of Intrastriatal 6-OHDA Lesions on Extrastriatal Brain Structures in the Mouse. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4240–4252, 14 jun. 2017.

BEUREL, E.; GRIECO, S. F.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): Regulation, actions, and diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 148, p. 114–131, abr. 2015.

BEUREL, E.; JOPE, R. S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. **Progress in Neurobiology**, v. 79, n. 4, p. 173–189, jul. 2006.

BIJUR, G. N.; JOPE, R. S. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is highly activated in nuclei and mitochondria. **NeuroReport**, v. 14, n. 18, p. 2415–2419, dez. 2003.

BIOSA, A. et al. Dopamine Oxidation Products as Mitochondrial Endotoxins, a Potential Molecular Mechanism for Preferential Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 9, n. 11, p. 2849–2858, 21 nov. 2018.

BIZAT, N. et al. In Vivo Calpain/Caspase Cross-talk during 3-Nitropropionic Acid-induced Striatal Degeneration. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 44, p. 43245–43253, out. 2003.

BLANDINI, F.; ARMENTERO, M.-T. Animal models of Parkinson's disease. **FEBS Journal**, v. 279, n. 7, p. 1156–1166, abr. 2012.

BLESA, J. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 9, n. July, p. 91, 8 jul. 2015.

BOVÉ, J.; PERIER, C. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 211, p. 51–76, jun. 2012.

BRICHTA, L.; GREENGARD, P. Molecular determinants of selective dopaminergic vulnerability in Parkinson's disease: an update. **Frontiers in Neuroanatomy**, v. 8, n. DEC,

\*De acordo com: ASOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NRB 6023: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro. 2002. 24p.

15 dez. 2014.

BRUNELLO, C. A. et al. Mechanisms of secretion and spreading of pathological tau protein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 77, n. 9, p. 1721–1744, 30 maio 2020.

BUHIDMA, Y. et al. Potential of animal models for advancing the understanding and treatment of pain in Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 6, n. 1, p. 1, 6 dez. 2020.

BURDICK, K. E. et al. The association between lithium use and neurocognitive performance in patients with bipolar disorder. **Neuropsychopharmacology**, v. 45, n. 10, p. 1743–1749, 29 set. 2020.

CADE, J. F. John Frederick Joseph Cade: Family Memories on the Occasion of the 50th Anniversary of his Discovery of the Use of Lithium in Mania. **Australian & New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 33, n. 5, p. 615–618, 26 out. 1999.

CALLIZOT, N. et al. Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins. **PLOS ONE**, v. 14, n. 4, p. e0215277, 25 abr. 2019.

CAPITELLI, C. et al. Melatonin attenuates tyrosine hydroxylase loss and hypolocomotion in MPTP-lesioned rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 594, n. 1–3, p. 101–108, out. 2008.

CHEN, L. et al. Tetramethylpyrazine Analogue CXC195 Protects Against Dopaminergic Neuronal Apoptosis via Activation of PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  Signaling Pathway in 6-OHDA-Induced Parkinson's Disease Mice. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 4, p. 1141–1150, 22 abr. 2017a.

CHEN, Y. et al. The expression and significance of tyrosine hydroxylase in the brain tissue of Parkinson's disease rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 14, n. 5, p. 4813–4816, 18 set. 2017b.

COLE, A.; FRAME, S.; COHEN, P. Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. **Biochemical Journal**, v. 377, n. 1, p. 249–255, 1 jan. 2004.



COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Aging and Parkinson's disease: Different sides of the same coin? **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 32, n. 7, p. 983–990, jul. 2017.

CREDLE, J. J. et al. GSK-3 $\beta$  dysregulation contributes to parkinson's-like pathophysiology with associated region-specific phosphorylation and accumulation of tau and  $\alpha$ -synuclein. **Cell Death & Differentiation**, v. 22, n. 5, p. 838–851, 14 maio 2015.

CURI, R.; ARAÚJO FILHO, J. P. **Fisiologia Básica**. 2. ed. [s.l.] Gen, 2017.

DAMRI, O.; SHEMESH, N.; AGAM, G. Is There Justification to Treat Neurodegenerative Disorders by Repurposing Drugs? The Case of Alzheimer's Disease, Lithium, and Autophagy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 189, 27 dez. 2020.

DAVIE, C. A. A review of Parkinson's disease. **British Medical Bulletin**, v. 86, n. 1, p. 109–127, 18 fev. 2008.

DE LAU, L. M.; BRETELER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 5, n. 6, p. 525–535, jun. 2006.

DE LAU, L. M. L. et al. Prognosis of Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 62, n. 8, p. 1265, 1 ago. 2005.

DE SARNO, P.; LI, X.; JOPE, R. S. Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylation by sodium valproate and lithium. **Neuropharmacology**, v. 43, n. 7, p. 1158–1164, dez. 2002.

DOBLE, B. W.; WOODGETT, J. R. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 7, p. 1175–1186, 1 abr. 2003.

DONALDSON, I. M.; CUNINGHAM, J. Persisting Neurologic Sequelae of Lithium Carbonate Therapy. **Archives of Neurology**, v. 40, n. 12, p. 747–751, 1 nov. 1983.

DORSEY, E. R. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, nov. 2018a.

DORSEY, E. R. et al. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. s1, p. S3–S8, 18 dez. 2018b.

DRUBIN, D. G.; KIRSCHNER, M. W. Tau protein function in living cells. **The Journal of Cell Biology**, v. 103, n. 6, p. 2739–2746, 1 dez. 1986.

DUCE, J. A. et al. Post translational changes to  $\alpha$ -synuclein control iron and dopamine trafficking; a concept for neuron vulnerability in Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 45, 7 dez. 2017.

EATON, S. L.; WISHART, T. M. Bridging the gap: large animal models in neurodegenerative research. **Mammalian Genome**, v. 28, n. 7–8, p. 324–337, 4 ago. 2017.

ELKOUZI, A. et al. Emerging therapies in Parkinson disease — repurposed drugs and new approaches. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 4, p. 204–223, 12 mar. 2019.

FARINA, E. et al. Lithium in the Normal Therapeutic Range: A Potential Sneaky Danger for the Brain. A Case of Slow Tricking Neurotoxicity and a Brief Overview of Literature. **Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism**, v. 07, n. 06, p. 1–4, dez. 2017.

FEIGIN, V. L. et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 11, p. 877–897, nov. 2017.

FERRER, I. et al. Neuropathology of sporadic Parkinson disease before the appearance of parkinsonism: preclinical Parkinson disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 118, n. 5, p. 821–839, 23 maio 2011.

FLORIO, T. M. et al. The Basal Ganglia: More than just a switching device. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 24, n. 8, p. 677–684, ago. 2018.

FOLCH, J. et al. Evaluation of transcriptional activity of caspase-3 gene as a marker of acute neurotoxicity in rat cerebellar granular cells. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 2, p. 465–471, mar. 2010.

FU, H.; HARDY, J.; DUFF, K. E. Selective vulnerability in neurodegenerative diseases. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1350–1358, 24 out. 2018.

FUNG, H. Y. J. et al. Structural Characterization of Tau in Fuzzy Tau:Tubulin Complexes. **Structure**, v. 28, n. 3, p. 378- 384.e4, mar. 2020.

GAJWANI, P. et al. Acute treatment of mania: An update on new medications. **Current Psychiatry Reports**, v. 8, n. 6, p. 504–509, nov. 2006.

GOLPICH, M. et al. Glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) signaling: Implications for Parkinson's disease. **Pharmacological Research**, v. 97, p. 16–26, jul. 2015.

GRANDJEAN, E. M.; AUBRY, J.-M. Lithium: Updated Human Knowledge Using an Evidence-Based Approach. **CNS Drugs**, v. 23, n. 4, p. 331–349, 2009.

GREENWOOD, S. G. et al. A Novel Neuroprotective Mechanism for Lithium That Prevents Association of the p75 NTR -Sortilin Receptor Complex and Attenuates proNGF-Induced Neuronal Death In Vitro and In Vivo. **eneuro**, v. 5, n. 1, p. ENEURO.0257-17.2017, jan. 2018.

GRILLNER, S.; ROBERTSON, B. The Basal Ganglia Over 500 Million Years. **Current Biology**, v. 26, n. 20, p. R1088–R1100, out. 2016.

GU, C. et al. P7C3 inhibits GSK3 $\beta$  activation to protect dopaminergic neurons against neurotoxin-induced cell death in vitro and in vivo. **Cell Death & Disease**, v. 8, n. 6, p. e2858–e2858, 1 jun. 2017.

GUO, J. et al. Damage to dopaminergic neurons by oxidative stress in Parkinson's disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 41, n. 4, p. 1817–1825, 19 jan. 2018.

HAY, G.; SIMPSON, N. NEUROTOXICITY ASSOCIATED WITH THERAPEUTIC SERUM LITHIUM LEVELS. **The Lancet**, v. 320, n. 8290, p. 160–161, jul. 1982.

HEDYA, S. A.; AVULA, A.; SWOBODA, H. D. **Lithium Toxicity**. [s.l.] StatPearls Publishing, 2021. v. 12

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; MENDOZA-GARRIDO, M. E.; MARTINEZ-FONG, D. Activation of GSK-3 $\beta$  and Caspase-3 Occurs in Nigral Dopamine Neurons during the Development of Apoptosis Activated by a Striatal Injection of 6-Hydroxydopamine. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e70951, 5 ago. 2013.

HERVY, J.; BICOUT, D. J. Dynamical decoration of stabilized-microtubules by Tau-proteins. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12473, 28 dez. 2019.

HEUER, A. et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 30–43, mar. 2012.

HLAING, P. M. et al. Neurotoxicity in chronic lithium poisoning. **Internal Medicine Journal**, v. 50, n. 4, p. 427–432, abr. 2020.

HOU, L. et al. Lithium protects dopaminergic cells from rotenone toxicity via autophagy enhancement. **BMC Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 82, 25 dez. 2015.

HOU, Y. et al. Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 10, p. 565–581, 9 out. 2019.

HUANG, S. et al. GSK-3 $\beta$  inhibitor TDZD-8 reduces neonatal hypoxic-ischemic brain injury in mice. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 405–415, maio 2017.

INKSTER, B. et al. GSK3 $\beta$ : a plausible mechanism of cognitive and hippocampal changes induced by erythropoietin treatment in mood disorders? **Translational Psychiatry**, v. 8, n. 1, p. 216, 11 dez. 2018.

JACOBS, K. M. et al. GSK-3: A Bifunctional Role in Cell Death Pathways. **International Journal of Cell Biology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

JACOBY, A. S. et al. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in patients with bipolar I disorder: results from a prospective study. **Bipolar Disorders**, v. 18, n. 4, p. 334–341, jun. 2016.

JOHNELS, B.; WALLIN, L.; WALINDER, J. Extrapyramidal side effects of lithium treatment. **BMJ**, v. 2, n. 6036, p. 642–642, 11 set. 1976.

KACZYŃSKA, K.; ANDRZEJEWSKI, K. 6-hydroxydopamine-induced model of Parkinson's disease. In: **Genetics, Neurology, Behavior, and Diet in Parkinson's Disease**. [s.l.] Academic Press, 2020. p. 627–642.

KASTNER, A. et al. Tyrosine hydroxylase protein and messenger RNA in the dopaminergic nigral neurons of patients with Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 606, n. 2, p. 341–345, mar. 1993.

KERR, L. E. et al. Mice overexpressing human caspase 3 appear phenotypically normal but exhibit increased apoptosis and larger lesion volumes in response to transient focal cerebral ischaemia. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 10, p. 1102–1111, 21 out. 2004.

KIM, W.-Y.; SNIDER, W. D. Functions of GSK-3 Signaling in Development of the Nervous System. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 4, n. NOV, nov. 2011.

KRISHNANKUTTY, A. et al. In vivo regulation of glycogen synthase kinase 3 $\beta$  activity in neurons and brains. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8602, 17 dez. 2017.

LAZZARA, C. A.; KIM, Y.-H. Potential application of lithium in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, n. OCT, p. 403, 27 out. 2015.

LEI, P. et al. Tau deficiency induces parkinsonism with dementia by impairing APP-mediated iron export. **Nature Medicine**, v. 18, n. 2, p. 291–295, 29 fev. 2012.

LEI, P. et al. Lithium suppression of tau induces brain iron accumulation and neurodegeneration. **Molecular Psychiatry**, v. 22, n. 3, p. 396–406, 12 mar. 2017.

LI, D.-W. et al. Association of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  with Parkinson's disease (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 2043–2050, jun. 2014a.

LI, J. et al. GSK-3 $\beta$  Contributes to Parkinsonian Dopaminergic Neuron Death: Evidence From Conditional Knockout Mice and Tideglusib. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 13, 3 jun. 2020.

LI, L. et al. Let-7d microRNA Attenuates 6-OHDA-Induced Injury by Targeting Caspase-3 in MN9D Cells. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 63, n. 3–4, p. 403–411, 29 dez. 2017.

LI, M. et al. Neuroprotection by Silencing iNOS Expression in a 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 48, n. 1, p. 225–233, 26 set. 2012.

LI, P.-F. et al. Lactuside B decreases aquaporin-4 and caspase-3 mRNA expression in the hippocampus and striatum following cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 7, n. 3, p. 675–680, mar. 2014b.

LI, W. et al. Lithium Posttreatment Alleviates Blood–Brain Barrier Injury After Intracerebral Hemorrhage in Rats. **Neuroscience**, v. 383, p. 129–137, jul. 2018.

LIU, Y.; ZHANG, Y.; YANG, Q. Retracted : Downregulated expression of microRNA-329 inhibits apoptosis of nigral dopaminergic neurons by regulating CDKN2D expression via the FoxO3a signaling pathway in rats with Parkinson's disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 11, p. 8617–8629, 15 nov. 2018.

LLORENS-MARÁ-TIN, M. et al. GSK-3 $\beta$ , a pivotal kinase in Alzheimer disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, n. MAY, 21 maio 2014.

LOCHHEAD, P. A. et al. A Chaperone-Dependent GSK3 $\beta$  Transitional Intermediate Mediates Activation-Loop Autophosphorylation. **Molecular Cell**, v. 24, n. 4, p. 627–633, nov. 2006.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and  $\alpha$ -synuclein. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–942, dez. 2002.

MAHUL-MELLIER, A.-L. et al. The process of Lewy body formation, rather than simply  $\alpha$ -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 9, p. 4971–4982, 3 mar. 2020.

MALLET et al. Cellular and Synaptic Dysfunctions in Parkinson's Disease: Stepping out of the Striatum. **Cells**, v. 8, n. 9, p. 1005, 29 ago. 2019.

MANOHAR, S. G. Tremor in Parkinson's disease inverts the effect of dopamine on reinforcement. **Brain**, v. 143, n. 11, p. 3178–3180, 1 nov. 2020.

MARRAS, C. et al. Lithium Use in Older Adults is Associated with Increased Prescribing of Parkinson Medications. **The American Journal of Geriatric Psychiatry**, v. 24, n. 4, p. 301–309, abr. 2016.

MARTIN, L. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A. **Brain Research**, v. 1252, p. 66–75, fev. 2009.

MAURER, U. et al. GSK-3 – at the crossroads of cell death and survival. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 7, p. 1369–1378, 1 abr. 2014.

MAYNARD, S. et al. DNA Damage, DNA Repair, Aging, and Neurodegeneration. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 10, p. a025130, out. 2015.

MCGREGOR, M. M.; NELSON, A. B. Circuit Mechanisms of Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 101, n. 6, p. 1042–1056, mar. 2019.

MEHRAFZA, S. et al. Pharmacological evidence for lithium-induced neuroprotection against methamphetamine-induced neurodegeneration via Akt- 1/GSK3 and CREB-BDNF signaling pathways. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 22, n. 8, p. 856–865, ago. 2019.

MENDES, C. T. et al. Lithium reduces Gsk3b mRNA levels: implications for Alzheimer Disease. **European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience**, v. 259, n. 1, p. 16–22, 17 fev. 2009.

MONACO, S. A.; FERGUSON, B. R.; GAO, W.-J. Lithium Inhibits GSK3 $\beta$  and Augments GluN2A Receptor Expression in the Prefrontal Cortex. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, p. 16, 1 fev. 2018.

MOTOI, Y. et al. Lithium and Autophagy. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 434–442, 18 jun. 2014.

NAGAO, M.; HAYASHI, H. Glycogen synthase kinase-3beta is associated with Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 449, n. 2, p. 103–107, jan. 2009.

NAIR, V. D.; OLANOW, C. W. Differential Modulation of Akt/Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Pathway Regulates Apoptotic and Cytoprotective Signaling Responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 22, p. 15469–15478, maio 2008.

NATIONS DEPARTMENT OF ECONOMIC, U.; AFFAIRS, S.; DIVISION, P. **World Population Ageing 2019**. [s.l.] UN, 2020.

NEMOTO, T. et al. Regulation of Akt mRNA and protein levels by glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in adrenal chromaffin cells: Effects of LiCl and SB216763. **European Journal of Pharmacology**, v. 586, n. 1–3, p. 82–89, maio 2008.

Neurological Disorders: Public Health Challenges. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 1, p. 154, 1 jan. 2008.

NOBLE, W. et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by lithium correlates with reduced tauopathy and degeneration in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 19, p. 6990–6995, 10 maio 2005.

OGUH, O.; VIDENOVIC, A. Inpatient Management of Parkinson Disease. **The Neurohospitalist**, v. 2, n. 1, p. 28–35, 23 jan. 2012.



OH, Y.-M. et al. Inhibition of 6-hydroxydopamine-induced endoplasmic reticulum stress by l-carnosine in SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters**, v. 459, n. 1, p. 7–10, jul. 2009.

PAN, J. Q. et al. AKT Kinase Activity Is Required for Lithium to Modulate Mood-Related Behaviors in Mice. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 7, p. 1397–1411, 9 jun. 2011.

PANDEY, M. K.; DEGRADO, T. R. Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK-3)-Targeted Therapy and Imaging. **Theranostics**, v. 6, n. 4, p. 571–593, 2016.

PAPADIMA, E. M. et al. Evidence towards RNA Binding Motif (RNP1, RRM) Protein 3 (RBM3) as a Potential Biomarker of Lithium Response in Bipolar Disorder Patients. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 62, n. 3–4, p. 304–308, 14 ago. 2017.

PARK, S. A.; AHN, S. II; GALLO, J.-M. Tau mis-splicing in the pathogenesis of neurodegenerative disorders. **BMB Reports**, v. 49, n. 8, p. 405–413, 31 ago. 2016.

PARKINSON, J. An Essay on the Shaking Palsy. **The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 14, n. 2, p. 223–236, maio 2002.

PATEL, P.; WOODGETT, J. R. Glycogen Synthase Kinase 3. In: **Current Topics in Developmental Biology**. [s.l.] Academic Press Inc., 2017. 123p. 277–302.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K. B. J. **Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. 4. ed. [s.l.] Academic Press, 2012.

PICON, P.; BELTRAME, A. Doença de Parkinson: Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas. **Consulta Pública SAS/MS**, v. 10, p. 235–246, out. 2002.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17013, 21 dez. 2017.

PONTONE, G. M. et al. Report from a multidisciplinary meeting on anxiety as a non-motor

manifestation of Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 5, n. 1, p. 30, 11 dez. 2019.

PRINGSHEIM, T. et al. The prevalence of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Movement Disorders**, v. 29, n. 13, p. 1583–1590, nov. 2014.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 251–259, 17 abr. 2017.

PUGLISI-ALLEGRA, S.; RUGGIERI, S.; FORNAI, F. Translational evidence for lithium-induced brain plasticity and neuroprotection in the treatment of neuropsychiatric disorders. **Translational Psychiatry**, v. 11, n. 1, p. 366, 5 jun. 2021.

PUSPITA, L.; CHUNG, S. Y.; SHIM, J. Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease. **Molecular Brain**, v. 10, n. 1, p. 53, 28 dez. 2017.

QI, L. et al. Lithium chloride promotes neuronal differentiation of rat neural stem cells and enhances neural regeneration in Parkinson's disease model. **Cytotechnology**, v. 69, n. 2, p. 277–287, 24 abr. 2017.

QIAO, J. et al. Involvement of Akt/GSK3 $\beta$ /CREB signaling pathway on chronic omethoate induced depressive-like behavior and improvement effects of combined lithium chloride and astaxanthin treatment. **Neuroscience Letters**, v. 649, p. 55–61, maio 2017.

REDGRAVE, P. et al. Goal-directed and habitual control in the basal ganglia: implications for Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 11, n. 11, p. 760–772, 14 nov. 2010.

REN, Y. et al. Role of c-Abl-GSK3 $\beta$  Signaling in MPP<sup>+</sup>-Induced Autophagy-Lysosomal Dysfunction. **Toxicological Sciences**, v. 165, n. 1, p. 232–243, 1 set. 2018.

RIGO, A. P.; LEVANDOVSKI, R. M.; TSCHIEDEL, B. Protocolo Clínico do Ministério da Saúde/Brasil para Doença de Parkinson: adesão e percepção do médico prescritor. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 26, n. 1, p. 197–208, jan. 2021.

RODRIGUEZ-PALLARES, J. et al. Mechanism of 6-hydroxydopamine neurotoxicity: the role

of NADPH oxidase and microglial activation in 6-hydroxydopamine-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 103, n. 1, p. 070615193023005-???, 15 jun. 2007.

SCHAPIRA, A. H.; CHAUDHURI, K. R.; JENNER, P. Non-motor features of Parkinson disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 7, p. 435–450, 8 jul. 2017.

SCHMUED, L. C.; FALLON, J. H. Fluoro-gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. **Brain Research**, v. 377, n. 1, p. 147–154, jul. 1986.

SHRIVASTAVA, P. et al. Anti-apoptotic and Anti-inflammatory effect of Piperine on 6-OHDA induced Parkinson's Rat model. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 680–687, abr. 2013.

SINGH, A. Oscillatory activity in the cortico-basal ganglia-thalamic neural circuits in Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience**, v. 48, n. 8, p. 2869–2878, out. 2018.

SONGIN, M. et al. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  and Its Phosphorylated Form (Y216) in the Paraquat-Induced Model of Parkinsonism. **Neurotoxicity Research**, v. 19, n. 1, p. 162–171, 9 jan. 2011.

SOTO, C.; PRITZKOW, S. Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. **Nature Neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 1332–1340, 24 out. 2018.

SOUTAR, M. P. M. et al. Evidence that glycogen synthase kinase-3 isoforms have distinct substrate preference in the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, n. 4, p. 974–983, nov. 2010.

SPILLANTINI, M. G.; GOEDERT, M. Tau pathology and neurodegeneration. **The Lancet Neurology**, v. 12, n. 6, p. 609–622, jun. 2013.

STANKOWSKI, J. N.; DAWSON, V. L.; DAWSON, T. M. Ironing out tau's role in parkinsonism. **Nature Medicine**, v. 18, n. 2, p. 197–198, 6 fev. 2012.

STOICA, R. et al. <scp>ALS</scp> / <scp>FTD</scp> -associated <scp>FUS</scp> activates <scp>GSK</scp> -3 $\beta$  to disrupt the <scp>VAPB</scp> – <scp>PTPIP</scp> 51 interaction and <scp>ER</scp> –mitochondria associations. **EMBO reports**, v. 17, n. 9, p. 1326–1342, 14 set. 2016.

SWIRSKI, M. et al. Evaluating the relationship between amyloid- $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein phosphorylated at Ser129 in dementia with Lewy bodies and Parkinson's disease. **Alzheimer's Research & Therapy**, v. 6, n. 5–8, p. 77, 1 dez. 2014.

SZETO, J. Y. Y. et al. Dementia in long-term Parkinson's disease patients: a multicentre retrospective study. **npj Parkinson's Disease**, v. 6, n. 1, p. 2, 7 dez. 2020.

TER HAAR, E. et al. Structure of GSK3beta reveals a primed phosphorylation mechanism. **Nature structural biology**, v. 8, n. 7, p. 593–6, jul. 2001.

THORNTON, T. M. et al. Failure to Inactivate Nuclear GSK3 $\beta$  by Ser389-Phosphorylation Leads to Focal Neuronal Death and Prolonged Fear Response. **Neuropsychopharmacology**, v. 43, n. 2, p. 393–405, 17 jan. 2018.

TIEU, K. A Guide to Neurotoxic Animal Models of Parkinson's Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 1, n. 1, p. a009316–a009316, 1 set. 2011.

TONDO, L. et al. Clinical use of lithium salts: guide for users and prescribers. **International Journal of Bipolar Disorders**, v. 7, n. 1, p. 16, 22 dez. 2019.

TORICELLI, M. et al. Microdose Lithium Treatment Reduced Inflammatory Factors and Neurodegeneration in Organotypic Hippocampal Culture of Old SAMP-8 Mice. **Cellular and Molecular Neurobiology**, p. 1–12, 8 jul. 2020.

TRIST, B. G.; HARE, D. J.; DOUBLE, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. **Aging Cell**, v. 18, n. 6, p. e13031, 20 dez. 2019.

TYSNES, O.-B.; STORSTEIN, A. Epidemiology of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission**, v. 124, n. 8, p. 901–905, 1 ago. 2017.

VALLÉE, A.; VALLÉE, J.-N.; LECARPENTIER, Y. Parkinson's Disease: Potential Actions of Lithium by Targeting the WNT/ $\beta$ -Catenin Pathway, Oxidative Stress, Inflammation and Glutamatergic Pathway. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 230, 25 jan. 2021.

VOLKMANN, C.; BSCHOR, T.; KÖHLER, S. Lithium Treatment Over the Lifespan in Bipolar Disorders. **Frontiers in Psychiatry**, v. 11, p. 377, 7 maio 2020.

WANG, S.-F. et al. Baicalein prevents 6-OHDA/ascorbic acid-induced calcium-dependent dopaminergic neuronal cell death. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8398, 21 dez. 2017.

WANG, Y. et al. Parkinson's Disease-Associated Dj-1 Mutations Increase Abnormal Phosphorylation of Tau Protein through Akt/Gsk-3 $\beta$  Pathways. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 51, n. 3, p. 911–918, 27 nov. 2013.

WANG, Y. et al. Oral berberine improves brain dopa/dopamine levels to ameliorate Parkinson's disease by regulating gut microbiota. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 1 dez. 2021.

WARE, K.; TILLERY, E.; LINDER, L. General pharmacokinetic/pharmacodynamic concepts of mood stabilizers in the treatment of bipolar disorder. **Mental Health Clinician**, v. 6, n. 1, p. 54–61, 1 jan. 2016.

WEBER, S.; MOLLENHAUER, B. Prodromal Parkinson disease — time is brain. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 6, p. 329–330, 6 jun. 2021.

WEINGARTEN, M. D. et al. A protein factor essential for microtubule assembly. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 72, n. 5, p. 1858–1862, 1 maio 1975.

WILLS, J. et al. Elevated tauopathy and alpha-synuclein pathology in postmortem Parkinson's disease brains with and without dementia. **Experimental Neurology**, v. 225, n. 1, p. 210–218, set. 2010.

WOODGETT, J. R. Molecular cloning and expression of glycogen synthase kinase-3/factor A.

**The EMBO Journal**, v. 9, n. 8, p. 2431–2438, ago. 1990.

WU, D.-M. et al. Salidroside Protection Against Oxidative Stress Injury Through the Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway in Rats with Parkinson's Disease. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1793–1806, 2018.

WU, Y.-W.; DING, J. B. A cell-type-specific jolt for motor disorders. **Nature Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 763–765, 25 jun. 2017.

XICOY, H.; WIERINGA, B.; MARTENS, G. J. M. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. **Molecular Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 10, 24 dez. 2017.

XIE, C. et al. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) as potent therapeutic strategy to ameliorates L-dopa-induced dyskinesia in 6-OHDA parkinsonian rats. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23527, 21 set. 2016.

XING, B. et al. Conditional depletion of GSK3b protects oligodendrocytes from apoptosis and lessens demyelination in the acute cuprizone model. **Glia**, v. 66, n. 9, p. 1999–2012, set. 2018.

YANG, K. et al. The Key Roles of GSK-3 $\beta$  in Regulating Mitochondrial Activity. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 4, p. 1445–1459, dez. 2017.

YANG, P. et al. Human Basic Fibroblast Growth Factor Inhibits Tau Phosphorylation via the PI3K/Akt-GSK3 $\beta$  Signaling Pathway in a 6-Hydroxydopamine-Induced Model of Parkinson's Disease. **Neurodegenerative Diseases**, v. 16, n. 5–6, p. 357–369, set. 2016.

YAO, H.-B. et al. Expression of glycogen synthase kinase-3 isoforms in mouse tissues and their transcription in the brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 23, n. 4, p. 291–297, maio 2002.

YONG, Y. et al. Lithium Fails to Protect Dopaminergic Neurons in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Neurochemical Research**, v. 36, n. 3, p. 367–374, 4 mar. 2011.

YOON, E. J.; MONCHI, O. Probable REM sleep behavior disorder is associated with longitudinal cortical thinning in Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 7, n. 1, p. 19, 2 dez. 2021a.

YOON, E. J.; MONCHI, O. Probable REM sleep behavior disorder is associated with longitudinal cortical thinning in Parkinson's disease. **npj Parkinson's Disease**, v. 7, n. 1, p. 19, 2 dez. 2021b.

YOUSEFSANI, B. S.; ASKIAN, R.; POURAHMAD, J. A new approach on lithium-induced neurotoxicity using rat neuronal cortical culture: Involvement of oxidative stress and lysosomal/mitochondrial toxic Cross-Talk. **Main Group Metal Chemistry**, v. 43, n. 1, p. 15–25, 29 abr. 2020.

YUAN, Y. et al. Overexpression of  $\alpha$ -Synuclein Down-Regulates BDNF Expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 6, p. 939–946, 20 ago. 2010.

YUSKAITIS, C. J. et al. Lithium ameliorates altered glycogen synthase kinase-3 and behavior in a mouse model of Fragile X syndrome. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, n. 4, p. 632–646, fev. 2010.

ZENG, X.-S.; GENG, W.-S.; JIA, J.-J. Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. **ASN Neuro**, v. 10, p. 175909141877743, 29 jan. 2018.

ZENG, Z. et al. Lithium ions attenuate serum-deprivation-induced apoptosis in PC12 cells through regulation of the Akt/FoxO1 signaling pathways. **Psychopharmacology**, v. 233, n. 5, p. 785–794, 2 mar. 2016.

ZHAI, H. et al. Baicalin attenuated substantia nigra neuronal apoptosis in Parkinson's disease rats via the mTOR/AKT/GSK-3 $\beta$  pathway. **Journal of Integrative Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 423, dez. 2019.