

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 original

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 β 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 β 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 β (GSK-3 β) 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 μl . Para o tratamento com LiCl utilizou-se a concentração de 4 mmol (concentração capaz de inibir a enzima GSK-3 β em modelos de camundongos), veiculados intraperitoneal por 13 dias. Em seguida, as amostras foram coletadas e avaliou-se a atividade da enzima GSK-3 β 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 β e nem na conformação ativa da enzima GSK-3 β (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 β nos animais que foram tratados com este composto. Em contrapartida, obtivemos um aumento

da expressão de GSK-3 β (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 β (Y216) está presente nos corpos celulares dos neurônios dopaminérgicos da SN e que nesta região, o aumento da GSK-3 β (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 β , desafiando o uso do lítio como estratégia terapêutica para a DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Tirosina hidroxilase. GSK-3 β (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 β 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 μl . To the LiCl treatment, a 4 mmol/kg/day dose (capable of inhibit the GSK-3 β 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 β 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 β mRNA nor in the active conformation of the GSK-3 β (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 β mRNA in animals treated with this compound. As a counterpoint, we had an increase in the GSK-3 β (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 β (Y216) is present in the cell bodies of dopaminergic neurons of the SN and that, in this region, the increase of GSK-3 β (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 β 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 β (Y216). LiCl.

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relação entre a complexa circuitaria formada pelo córtex, núcleos da base, tálamo, medula e as vias de neurotransmissores envolvidas.....	26
Figura 2 – Via direta e a via indireta do circuito motor em um modelo fisiológico e na Doença de Parkinson.....	28
Figura 3 – Sequência das regiões afetadas pela injeção unilateral de 6-OHDA intraestriatal.....	29
Figura 4 – Representação esquemática das isoformas da GSK-3: a enzima GSK-3 α e a enzima GSK-3 β	32
Figura 5 – Desenho experimental da análise do processo neurodegenerativo e do tratamento com o LiCl em camundongos C57BL/6.....	43
Figura 6 – Figura representativa da progressão da lesão induzida pela administração da concentração de 12 μ 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
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 μ g de 6-OHDA veiculadas através de uma microseringa Hamilton®, nas coordenadas estereotáticas padronizadas.....	53
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.....	54
Figura 9 – Imagem representativa da lesão retrógrada na região do mesencéfalo de camundongo C57BL/6J, 24 horas após a administração de 6-OHDA.....	54
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 estereotáticas padronizadas.....	55
Figura 11 – 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

Figura 12 – Gráfico da expressão gênica de TH na região da Substância Negra. Os resultados de PCR quantitativo foram analisados através do método de $\Delta\Delta CT$	57
Figura 13 – Gráficos da expressão gênica de AKT, GSK-3 β e Caspase-3 nas regiões do Estriado e da Substância Negra.....	59
Figura 14 – Análise da expressão de GAPDH no hemisfério experimental direito no estriado (striatum) e da substância negra (substantia nigra) por <i>immunoblotting</i>	61
Figura 15 – Análise da expressão proteica de GSK-3, GSK-3 α e GSK-3 β normalizadas por GAPDH no hemisfério experimental direito no estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i>	63
Figura 16 – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 α e pGSK-3 β normalizadas por GAPDH no hemisfério experimental nas regiões do estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i>	64
Figura 17 – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 α e pGSK-3 β normalizadas por GSK-3 no hemisfério experimental direito do estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i>	66
Figura 18 – Análise da expressão de pGSK-3 α normalizadas por GSK-3 α e pGSK-3 β normalizadas por GSK-3 β no hemisfério experimental direito do estriado (striatum) por <i>immunoblotting</i>	67
Figura 19 – Análise da expressão de GSK-3, GSK-3 α e GSK-3 β normalizadas por GAPDH na substância negra (substantia nigra) por <i>immunoblotting</i>	69
Figura 20 – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 α e pGSK-3 β normalizadas por GAPDH na substância negra (substantia nigra) direita por <i>immunoblotting</i>	70
Figura 21 – Análise da expressão de pGSK-3, pGSK-3 α e pGSK-3 β normalizadas por GSK-3 na substância negra (substantia nigra) direita por <i>immunoblotting</i>	72
Figura 22 – Análise da expressão de pGSK-3 α normalizadas por GSK-3 α e pGSK-3 β normalizadas por GSK-3 β 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
- Fe²⁺** – Íon Ferro II
- GPe** – Globo pálido externo
- GPi** – Globo pálido interno
- GSK-3** – Glicogênio Sintase Quinase 3
- GSK-3 α** – Glicogênio Sintase Quinase 3 α
- GSK-3 β** – Glicogênio Sintase Quinase 3 β
- 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

Mg²⁺ – 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

α -Syn – α -Sinucleína

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Doenças neurodegenerativas	21
1.2 Doença de Parkinson	21
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
1.3 A enzima GSK-3β	31
1.3.1 <i>A regulação da atividade da enzima GSK-3β por proteínas quinases.....</i>	33
1.3.2 <i>Função serina/treonina quinase da enzima GSK-3β nos substratos Tau e α-Syn</i>	34
1.4 Mecanismos modulatórios do lítio na atividade da enzima GSK-3β	36
2 OBJETIVO.....	Erro! Indicador não definido.
3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	Erro! Indicador não definido.
4 METODOLOGIA.....	Erro! Indicador não definido.
4.1 Animais	Erro! Indicador não definido.
4.2 Delineamento experimental	Erro! Indicador não definido.
4.4 Indução do modelo de Doença de Parkinson por meio da administração de 6-OHDA	Erro! Indicador não definido.
4.5 Tratamento com o cloreto de lítio intraperitoneal	Erro! Indicador não definido.
4.6 Imuno-histoquímica.....	Erro! Indicador não definido.
4.7 Real Time PCR	Erro! Indicador não definido.
4.7.1 <i>Extração de RNA</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
4.7.2 <i>Purificação do RNA.....</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
4.7.3 <i>Síntese de cDNA</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
4.7.4 <i>Reações de PCR quantitativo (qPCR).....</i>	<i>Erro! Indicador não definido.</i>
4.8 Immunoblotting	Erro! Indicador não definido.
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	Erro! Indicador não definido.
6 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido.
6.1 Padronização da concentração de 6-OHDA.....	Erro! Indicador não definido.
6.2 Lesão induzida por 6-OHDA 24 horas após o procedimento cirúrgico..	Erro! Indicador não definido.
6.3 Localização da pGSK-3 ativa no mesencéfalo de camundongos C57BL/6J.....	Erro! Indicador não definido.
6.4 Análise da expressão gênica de TH, AKT, GSK-3β e Caspase-3 por RT-PCR:	Erro! Indicador não definido.
6.5 Análise da expressão proteica do GAPDH para o seu uso como proteína normalizadora:.....	Erro! Indicador não definido.

6.6 Análise da expressão proteica de GSK-3, GSK-3α, GSK-3β, pGSK-3α (Y279) e pGSK-3β (Y216) no estriado:	Erro! Indicador não definido.
6.7 Análise da expressão proteica GSK-3, GSK-3α, GSK-3β, pGSK-3α (Y279) e pGSK-3β (Y216) na substância negra:	Erro! Indicador não definido.
7 DISCUSSÕES	Erro! Indicador não definido.
8 CONCLUSÃO	40
REFERÊNCIAS*	41

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 (α -sinucleína (α -Syn), TAU, β -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; YOON; MONCHI, 2021; RIGO; LEVANDOVSKI; TSCHIEDEL, 2021; WEBER; MOLLENHAUER, 2021).

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).

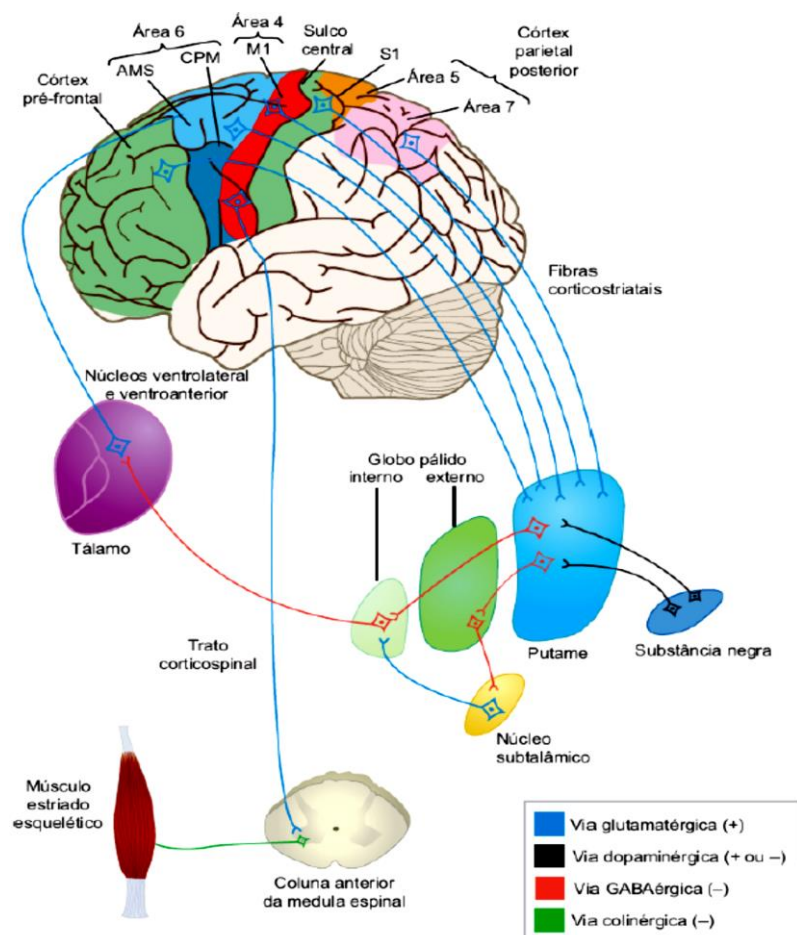


Figura 1 – Relação entre a complexa circuitaria formada pelo córtex, núcleos da base, tálamo, medula e as vias de neurotransmissores envolvidas. Na porção superior da figura estão representadas as áreas corticais relacionadas ao controle motor: M1 (córtex motor primário), CPM (córtex pré-motor), AMS (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).

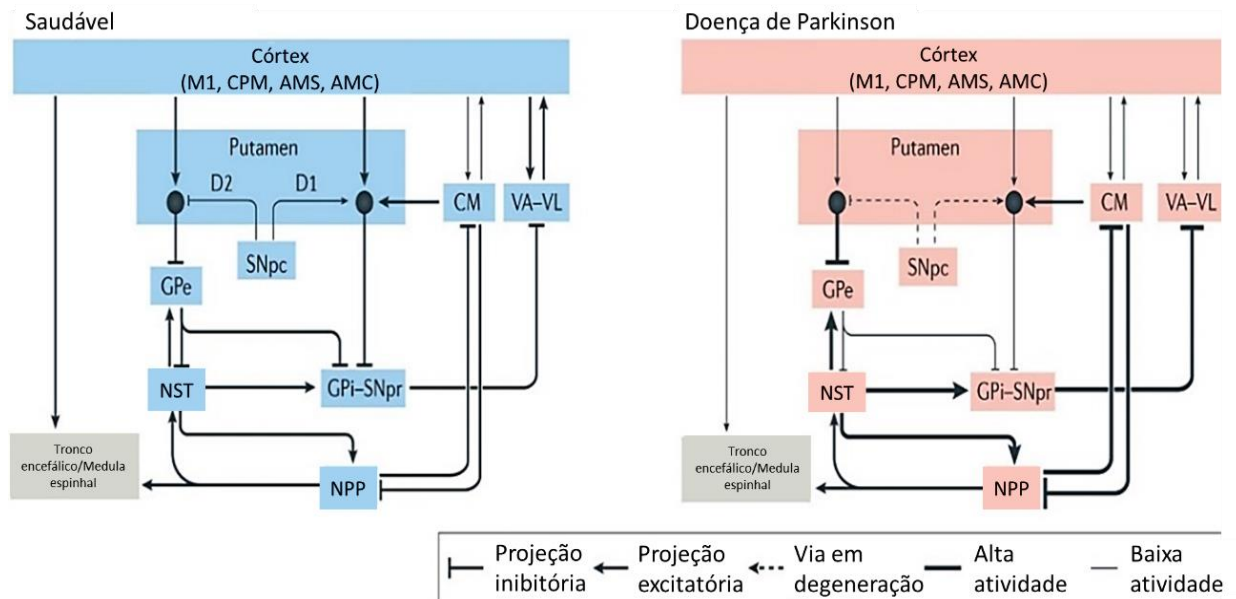


Figura 2 – Via direta e a via indireta do circuito motor em um modelo fisiológico e na Doença de Parkinson. Legenda: globo pálido interno (GPi); globo pálido externo (GPe); núcleos subtalâmicos (NST); substância negra *pars compacta* (SNpc) e substância negra *pars reticulada* (SNpr), VA (tálamo anterior 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).

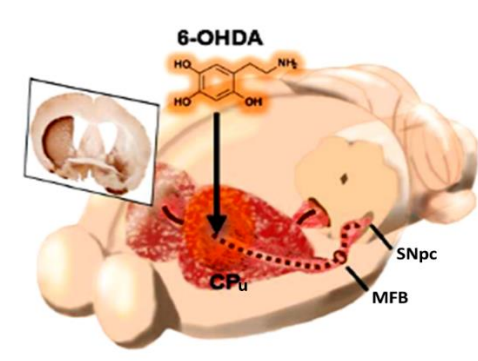


Figura 3 – Sequência das regiões afetadas pela injeção unilateral de 6-OHDA intraestriatal. CPu - Caudado putamen, MFB – Feixe do prosencéfalo medial, SNpc- Substância negra *pars compacta*. Adaptado de BECKER et al., 2017.

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 β

Dentre as vias de sinalização que estão relacionadas com a morte neuronal dopaminérgica, pode ser mencionada a via da enzima Glicogênio Sintase Quinase-3 β (GSK-3 β). A GSK-3 β 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 α (GSK-3 α) (banco de proteínas número de acesso: NP_063937.2) e a GSK-3 β (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 α da GSK-3 β , como por exemplo, a codificação das enzimas ser realizada em cromossomos distintos. A enzima GSK-3 α é codificada no cromossomo 7 em camundongo (cromossomo 19 em humano) e a enzima GSK-3 β é codificada no cromossomo 16 em camundongo (cromossomo 3 em humano) (YAO et al., 2002). Outro importante contraste existente entre as enzimas GSK-3 α e a GSK-3 β está no peso molecular (PM). A GSK-3 α possui um PM de 51 kDa e a GSK-3 β 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 α , 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 α e a GSK-3 β 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 α e GSK-3 β em camundongos e demonstrou-se que a deleção de GSK-3 β é letal para estes animais, em compensação os camundongos que não expressaram a GSK-3 α eram viáveis e relativamente normais (YAO et al., 2002; LI et al.,

2014). 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 α e a GSK-3 β foram consideradas quinases não idênticas estruturais e funcionalmente (PANDEY; DEGRADO, 2016).

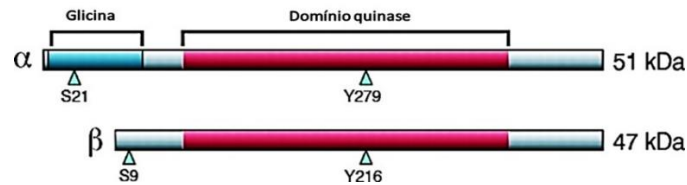


Figura 4 – Representação esquemática das isoformas da GSK-3: a enzima GSK-3 α e a enzima GSK-3 β . Nesta figura está enfatizada a homologia do domínio quinase (catalítico) das isoformas α e β da GSK-3. Em contrapartida está sendo demonstrado que os diferentes pesos moleculares são obtidos a partir da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

Apesar disso, tanto a GSK-3 α quanto a GSK-3 β 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 β 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 α , 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 β realizar uma ampla gama de funções que contribuem com a manutenção da homeostase cerebral, tem-se correlacionado o desbalanço da expressão da GSK-3 β 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 β . A GSK-3 β 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 β 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 β 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 β 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 β por proteínas quinases

A atividade enzimática da GSK-3 β é um processo complexo e que apresenta inúmeros mecanismos envolvidos. Krishnankutty e colaboradores demonstraram existir três fosfoisotipos de GSK-3 β responsáveis por modular prioritariamente a atividade multifuncional e determinar o destino da célula em cérebros de camundongos: a GSK-3 β fosforilada em Serina 9 [GSK-3 β (S9)] e em Tirosina 216 (Y216), a GSK-3 β fosforilada apenas em Y216 [GSK-3 β (Y216)] e a GSK-3 β não fosforilada (KRISHNANKUTTY et al., 2017). Em suma, quando a GSK-3 β encontra-se fosforilada em Y216, a sua atividade catalítica aumenta cerca de 200 vezes (TER HAAR et al., 2001) e quando a GSK-3 β 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 β 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 β 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 β (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 β (PATEL; WOODGETT, 2017). Este tipo de modulação negativa da atividade da GSK-3 β 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 β .

1.3.2 Função serina/treonina quinase da enzima GSK-3 β nos substratos Tau e α -Syn

Após ser encontrada fosforilada em GSK-3 β (Y216), a enzima GSK-3 β 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 β em uma serina/treonina quinase madura (LOCHHEAD et al., 2006). A alta expressão de GSK-3 β (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., 2014). Além disso, a conformação ativa da GSK-3 β (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 β que foram relatados como influentes na morte dopaminérgica na SN podem ser mencionados a α -Sinucleína (α -Syn) e a proteína Tau.

A α -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 α -Syn fosforilada no cérebro post-mortem de pacientes com DP (SWIRSKI et al., 2014). A possível justificativa para este fato está na capacidade da α -Syn sofrer modificações pós-traducionais em circunstâncias patológicas que alteram a sua conformação nativa, gerando oligômeros prejudiciais aos neurônios em que se encontram. A α -Syn disfuncional tende a se agregar e se depositar em algumas organelas. Dessa forma, estes depósitos fibrilares de α -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 β nos LBs (NAGAO; HAYASHI, 2009) foi uma observação que fundamentou a influência da GSK-3 β na patogênese da DP. Assim, muitos estudos procuram compreender como se dá esta correlação. Logo, foi verificado que a superexpressão da α -Syn compactua com a redução da fosforilação GSK-3 β (S9), mas não influencia a quantidade de proteína GSK-3 β total (YUAN et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que a enzima GSK-3 β (Y216), transfere um grupo de fosfato para a α -Syn na posição S129 nos neurônios TH⁺ da SN (CREDLE et al., 2015). E a ação direta da enzima GSK-3 β potencializa a formação da α -Syn anômala, comprometendo assim, as funções homeostáticas da α -Syn que enaltecem o estresse oxidativo nigral.

Assim como a α -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 (Fe²⁺) (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 β 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⁺ da SN por meio de redução da fosforilação da Tau e da GSK-3 β , 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 β (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 β .

1.4 Mecanismos modulatórios do lítio na atividade da enzima GSK-3 β

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 α -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 β) e atuam por meio da inibição desta enzima em frentes diretas e indiretas. De maneira direta, o lítio inibe a enzima GSK-3 β 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 β . E por fim, o outro mecanismo inibitório exercido pelo lítio na enzima GSK-3 β acontece indiretamente através do estímulo de algumas quinases que são responsáveis por promover o aumento da fosforilação inibitória em GSK-3 β (S9). Esta fosforilação em serina 9 é realizada principalmente pela AKT e influencia a atividade enzimática da GSK-3 β (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 β 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 β , além de diminuir o acúmulo de α -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 β , 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 β 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 β . 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⁺ 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.

8 CONCLUSÃO

Nós constatamos a existência de um efeito antagônico do uso LiCl aumentando a taxa de fosforilação de GSK-3 β (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 α -Amyloid Precursor Protein. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 8, p. 3591–3597, 25 fev. 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 α and GSK-3 β . **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 β . **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.
- BECKER, B. et al. Effect of Intrastratial 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 β is highly activated in nuclei and mitochondria. **NeuroReport**, v. 14, n. 18, p. 2415–2419, dez. 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, 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.
- 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 β dysregulation contributes to parkinson's-like pathophysiology with associated region-specific phosphorylation and accumulation of tau and α -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.
- 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.; BRETHER, 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 β 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 α -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.

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 β) 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 β 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

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

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 β 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 β : 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 β 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.

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 β 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 β with Parkinson's disease (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 6, p. 2043–2050, jun. 2014.

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

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

LLORENS-MARÀ-TIN, M. et al. GSK-3 β , 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 β 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 α -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 α -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 β 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.

MONACO, S. A.; FERGUSON, B. R.; GAO, W.-J. Lithium Inhibits GSK3 β 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 β 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.

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.
- 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.
- 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 β Signaling in MPP⁺-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.
- 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.

- 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 β 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- β and α -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.
- 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/ β -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 β 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, 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 β (GSK-3 β) 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.

YANG, K. et al. The Key Roles of GSK-3 β 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 β 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.

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. 2021.

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 α -Synuclein Down-Regulates BDNF Expression. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 30, n. 6, p. 939–946, 20 ago. 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.