

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

Influência de LPS e dos receptores Toll-like 4 na discinesia induzida por
L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos

Aluna de mestrado: Grazielle Rodriguez Carlos Monteiro

Orientador: Elaine Aparecida Del-Bel Guimarães

Co-orientador: Maurício dos Santos Pereira

2023

Graziele Rodriguez Carlos Monteiro

Influência de LPS e dos receptores Toll-like 4 na discinesia induzida por
L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos

Dissertação apresentada ao departamento
de Fisiologia da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como requisito para a obtenção do
título de mestre em Fisiologia.

Orientador: Elaine Aparecida Del-Bel
Guimarães

Co-orientador: Maurício dos Santos
Pereira

Ribeirão Preto
2023

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

Monteiro, Grazielle Rodriguez Carlos

Influência de LPS e dos receptores Toll-like 4 na discinesia induzida por L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos, 2023.

86 p. : il. ; 30 cm

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

Orientador: Del-Bel, Elaine.

1. Doença de Parkinson. 2. Discinesia. 3. Neuroinflamação. 4. LPS. 5. TLR4.

Ribeirão Preto

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Profª Dra. Elaine Del-Bel por ter aberto as portas do laboratório para meu ingresso, trabalho e desenvolvimento. Agradeço também ao meu co-orientador Dr. Maurício dos Santos Pereira, por todas as guias, instruções e ensinamentos.

Um agradecimento especial para meu bom amigo Leonardo Vanderlei Calaça que me aguentou, ensinou, me ouviu e foi meu companheiro e parceiro em todos os momentos bons e difíceis, quem nunca soltou minha mão e com quem eu sempre pude contar. O amigo mais brilhante que poderia pedir e a pessoa de coração mais leve. Um ser iluminado. Se Deus existisse, ele tocou o coração dessa criatura.

Um outro agradecimento especial para o Profº Dr. Ricardo Leão, por ter acreditado em mim e por ter me incentivado. Foi quem me fez reconquistar a luz perdida do olhar e toda sua doçura, humanidade e competência me fez voltar a acreditar em um futuro próspero. Obrigada por estar por mim quando mais ninguém estava. Você fez toda a diferença para minha vida acadêmica e por isso sou eternamente grata.

Por fim agradeço minha família. Minha mãe foi mais do que meu fundamento, minha guia, minha estrutura. Obrigada por ser uma mãe acolhedora, que sempre me apoiou e me orientou. Toda ajuda que precisei em minha vida, eu não seria nada sem você, mãe. Aos meus irmãos Nick, Gi e Bel, vocês são tudo na minha vida e eu amo cada um de vocês eternamente. Meu amor incondicional por vocês nos mantém unidos mesmo quando não estamos e por vocês eu sou eternamente grata por todos os momentos, rizadas, brigas e abraços. À minha família eu devo tudo e agradeço imensamente por serem esse elo de comunhão.

Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Também gostaria de agradecer à CAPES, por permitir que se faça pesquisa no país. O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Nome: MONTEIRO, Grazielle Rodriguez Carlos

Título: Influência de LPS e receptores Toll-like 4 na discinesia induzida por L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

(i) **RESUMO**

Influência de LPS e dos receptores Toll-like 4 na discinesia induzida por L-DOPA em camundongos hemiparkinsonianos

A doença de Parkinson (DP) é uma desordem neurodegenerativa progressiva e incapacitante que afeta principalmente indivíduos com mais de 65 anos, e não tem cura. A morte dos neurônios dopaminérgicos da substância negra compacta e o acúmulo da proteína α -sinucleína, são as principais características fisiopatológicas desta doença. O tratamento medicamentoso padrão-ouro da DP é feito com doses orais do precursor de dopamina, a L-DOPA. Apesar do tratamento ser efetivo para o alívio dos sintomas motores, não impede a morte progressiva dos neurônios dopaminérgicos e, a longo prazo, promove efeitos adversos irreversíveis. Dentre os efeitos colaterais decorrentes do uso crônico da L-DOPA, o mais perturbador é a manifestação de movimentos anormais involuntários (AIMs, de “*abnormal involuntary movements*”), chamados conjuntamente de discinesia induzida por L-DOPA (LID, de “*L-DOPA-induced dyskinesia*”). Em humanos, a LID é caracterizada por movimentos aleatórios do tipo coreia e balístico, que acomete os membros superiores, a mandíbula e o tronco, que gera profundo impacto na qualidade de vida do paciente. Uma vez instaurada, a LID volta a aparecer toda vez que o paciente faz uso da droga, no pico de concentração plasmática da L-DOPA. Nosso grupo mostrou em modelos de roedores com DP, que o tratamento crônico com L-DOPA promove resposta neuroinflamatória, com aumento de citocinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (como óxido nítrico), aumento da expressão de enzimas pró-inflamatórias (como COX-2 e iNOS), além de astrogliose e microgliose. Nesse sentido, os achados parecem ser componentes-chave para o estabelecimento, promoção e, possivelmente, tratamento da discinesia. Sabendo que o lipopolissacarídeo (LPS) é um agonista típico dos receptores Toll-like 4 (TLR4), e a ativação dos receptores TLR4 é importante para o início da resposta imunológica, o presente estudo visa correlacionar a neuroinflamação da LID, exacerbada por LPS, com a cascata de sinalização do TLR4. Utilizamos camundongos C57/BL estimulados com LPS i.p. um dia antes de iniciar o tratamento diário com de L-DOPA (i.p. 25 mg/kg + benserazida 10 mg/kg) por 15 dias. Nesses camundongos observamos significativo aumento dos escores de LID estimulado pelo pré-tratamento com LPS. Esses resultados indicam que há perspectivas promissoras a se investigar nesta cascata, sendo, todavia, inconclusivos para determinar se a sinalização de TLR4 é determinante ou não da manifestação da LID.

Palavras-chave: doença de Parkinson, discinesia, neuroinflamação, LPS, TLR4.

(ii) **ABSTRACT**

Influence of LPS and Toll-like 4 receptors on L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice

Parkinson's disease (PD) is a progressive and disabling neurodegenerative disorder that mainly affects individuals over 65 years of age and currently has no cure. The death of neurons in the Substantia Negra Compacta and the generalized accumulation of the α -synuclein protein are the main pathophysiological characteristics of this disease. The gold standard drug treatment for PD is oral doses of the dopamine precursor, L-DOPA. Although the treatment is effective in relieving motor symptoms, it does not prevent the progressive death of dopaminergic neurons in substantia nigra, and, in addition, over time it promotes irreversible adverse effects, such as dyskinesia induced by L-DOPA (LID). Among the side effects caused by the chronic use of L-DOPA, the abnormal involuntary movements (AIMs) is characterized by random movements of the chorea and ballistic type, which affects the upper limbs, jaw and trunk, with major impacts on the patient's quality of life. Once established, LID reappears every time the patient uses the drug, while L-DOPA is at its peak plasma concentration. Our research group has previously observed in mouse models of PD that, in addition to the brain injury, chronic treatment with L-DOPA promotes a typical neuroinflammatory response, with an increase in cytokines, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO), increased expression of pro-inflammatory enzymes (such as COX-2 and iNOS), and also astrogliosis and microgliosis. In this context, these findings appear to be key components for the establishment, promotion and, possibly, treatment of dyskinesia. Lipopolysaccharide (LPS), a typical Toll-like receptor 4 (TLR4) agonist, activates TLR4 receptors and initiate innate immune responses. Therefore, our present study aims to correlate neuroinflammation with LID, which became more severe by LPS, with the TLR4 signaling cascade. To assess LID neuroinflammation through TLR4 signaling, we used C57/BL mice stimulated with LPS i.p. one day before starting the 15 daily single dose of 25 mg/kg of L-DOPA (i.p. and benserazide 10 mg/kg). In these mice, we observed a significant increase in LID scores, and TLR4 and MyD88 mild expression by *western blot*. These results are still inconclusive to determine whether TLR4 signaling is decisive or not for the manifestation of LID, but they indicate that there is still great perspective to be further investigated.

Keywords: Parkinson's disease, dyskinesia, neuroinflammation, LPS, TLR4.

(iii) LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos moleculares envolvidos com a patologia da doença de Parkinson.

Figura 2: Mecanismos moleculares e enzimáticos da dopamina, que favorecem a produção de EROs.

Figura 3: Mecanismos imunológico-oxidativo presente na neuroinflamação da doença de Parkinson.

Figura 4: Biossíntese da dopamina.

Figura 5: Metabolismo dopaminérgico: síntese, armazenamento, exocitose, metabolismo e ligantes extracelulares.

Figura 6: Subtipos de receptores dopaminérgicos, agrupados nas famílias D1 e D2.

Figura 7: Metabolismo e subprodutos do metabolismo da dopamina.

Figura 8: Alças locomotoras do SNC.

Figura 9: Modelo clássico das mudanças fisiológicas na alça motora dos núcleos da base que ocorrem na LID.

Figura 10: Figura representativa do mecanismo de liberação anormal de dopamina por terminais sinápticos de neurônios não-dopaminérgicos.

Figura 11: Mecanismos neuropatológicos da neuroinflamação da LID.

Figura 12: Via de sinalização do TLR4.

Figura 13: Imagem ilustrativa de um aparelho de cirurgia estereotáxica com as especificações da cirurgia.

Figura 14: Imagem ilustrativa do conceito fisiológico do teste de giros induzidos por Apomorfina.

Figura 15: Desenho experimental da curva dose-resposta de LPS.

Figura 16: Fotos termográficas de camundongos: à esquerda está o camundongo com o vetor de maior intensidade de temperatura focado em seu olho esquerdo.

Figura 17: Desenho experimental e linha do tempo.

Figura 18: Representação ilustrativa da análise da discinesia.

Figura 19: Modelo representativo do protocolo experimental da técnica de *Western blot*.

Figura 20: Passo-a-passo ilustrativo do método de imunohistoquímica para a marcação da Tirosina Hidroxilase em fatias do cérebro de camundongos hemiparkinsonianos.

Figura 21: Demonstração do processo de Imunohistoquímica.

Figura 22: Curva dose-resposta do LPS – Temperatura corporal.

Figura 23: Curva dose-resposta do LPS - Análise Locomotora.

Figura 24: Giros induzidos por Apomorfina (Grupo 1).

Figura 25: Giros induzidos por Apomorfina (Grupo 2).

Figura 26: Análise da Discinesia induzida por L-DOPA (Grupo 1).

Figura 27: Análise da Discinesia induzida por L-DOPA (Grupo 2).

Figura 28: Análise do conteúdo de proteínas do estriado dorso-lateral lesionado, por meio da técnica de *Western blot*.

Figura 29: Quantificação da densidade óptica da Tirosina Hidroxilase na Substância Negra compacta.

(iv) **LISTA DE ABREVIACÕES**

5-HT: serotonina

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

AADC: descarboxilase de aminoácidos aromáticos

AIMs: movimentos anormais involuntários

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AP-1: proteína 1 de ativação nuclear

APCs: células apresentadoras de antígenos profissionais

BHE: barreira hemato-encefálica

CD: cluster de diferenciação

COMT: catecol-o-metil transferase

COX: ciclooxigenase

DA: dopamina

DAG: diacilglicerol

DAMPs: padrões moleculares associados a danos celulares

DARPP-32: fosfoproteína 32 regulada por dopamina e AMP cíclico

DAT: transportador citosólico de dopamina

DP: doença de Parkinson

EGF: fator de crescimento epidermal

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

EROS: espécies reativas de oxigênio

GPe: Globo Pálido externo

GPI: Globo Pálido interno

HVA: ácido homovanílico

IFN: interferon

IL: interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IP₃: inositol trifosfato

IRAK: quinase associada ao receptor de interleucina-1

IκK: inibidor de NF-κB

JNK: quinase Jun N-terminal

LBP: proteína de ligação ao LPS

L-DOPA: L-3,4-diidroxifenilalanina

LID: discinesia induzida por L-DOPA

LNAAs: transportador de L-aminoácidos neutros

LPS: lipopolissacarídeo

MAO: monoamina-oxidase

MHC: complexo principal de histocompatibilidade

MPO: mieloperoxidase

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

MyD88: proteína 88 de resposta primária à diferenciação mieloide

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NF-κB: fator nuclear kappa B

NMDA: N-metil-D-aspartato

NO: óxido nítrico

PAMPs: padrões moleculares associados a patógenos

PIP₂: fosfatidil inositol 4,5-bifosfato

PKC: fosfoquinase C

Snc: parte compacta da Substância Negra

SNC: sistema nervoso central

STN: núcleo Subtalâmico

TAB: proteína de ligação ao TAK

TAK1: quinase 1 transformadora do fator de crescimento ativado em beta

TH: tirosina-hidroxilase

TIR: domínio do receptor toll de interleucina

TLR4: receptor Toll-like 4

TNF: fator de necrose tumoral

TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF

VMAT: transportador vesicular de monoaminas

α-sin: α-sinucleína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	A DOENÇA DE PARKINSON.....	12
1.1.1	HISTÓRICO.....	12
1.1.2	SINTOMAS	14
1.1.3	DIAGNÓSTICO.....	14
1.1.4	FISIOPATOLOGIA	15
1.1.4.1	MORTE DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS.....	15
1.1.4.2	ACÚMULO DE α -SINUCLEÍNA E PRESENÇA DE CORPOS DE LEWY	16
1.1.4.3	NEUROINFLAMAÇÃO.....	18
1.2	DOPAMINA	23
1.2.1	DOPAMINA: SINTESE, METABOLISMO E AÇÕES BIOQUÍMICAS	23
1.2.2	VIA DOPAMINÉRGICA NO SNC – A ALÇA MOTORA.....	26
1.3	TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON.....	28
1.3.1	EFEITOS COLATERAIS DA L-DOPA	29
1.4	NEUROINFLAMAÇÃO E O TRATAMENTO CRÔNICO COM L-DOPA.....	33
1.5	NEUROINFLAMAÇÃO E TLR4.....	35
1.5.1	O QUE É O RECEPTOR TOLL-LIKE 4	35
1.5.2	SINALIZAÇÃO DE TLR4 – CONCEITOS GERAIS	37
1.5.3	SINALIZAÇÃO DE TLR4 – CONCEITOS GERAIS	39
1.5.4	SINALIZAÇÃO DE TLR4 – SNC.....	40
1.5.4.1	SINALIZAÇÃO DE TLR4 NA DOENÇA DE PARKINSON.....	41
2	HIPÓTESE.....	43
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1	ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO	44
4.2	DROGAS UTILIZADAS	44
4.3	LESÃO INTRAESTRIATAL – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	44
4.4	ANÁLISE DA EXTENSÃO DA LESÃO COM 6-OHDA: CONTAGEM DE GIROS INDUZIDOS POR APOMORFINA	46
4.5	DETERMINAÇÃO DA DOSE DE LPS: TESTE DA TEMPERATURA.....	47
4.6	DESENHO EXPERIMENTAL	49
4.7	INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DA DISCINESIA.....	50
4.8	ANÁLISE DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA (LID).....	50
4.9	ANÁLISE LOCOMOTORA – TESTE NO ACTÍMETRO.....	52
4.10	PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA ANÁLISES <i>POST-MORTEM</i>	53

4.11	ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS DO ESTRIADO DORSOLATERAL: WESTERN BLOT - SDS-PAGE (WB)	53
4.12	ANÁLISE DA INTENSIDADE DA LESÃO COM 6-OHDA: IMUNOHISTOQUÍMICA	54
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	57
5	RESULTADOS	58
5.1	CURVA DOSE-RESPOSTA LPS: INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA	58
5.2	CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL DA LESÃO ESTRIATAL COM 6-OHDA	59
5.3	EXACERBAÇÃO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA VIA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA POR LPS	61
5.4	EXPRESSÃO DE FATORES A MONTANTE (UPSTREAM) DA CASCATA DO TLR4	67
5.5	CONFIRMAÇÃO DA LESÃO PELA EXPRESSÃO DA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE (TH)	68
6	DISCUSSÃO	70
6.1	CURVA DOSE-RESPOSTA LPS: INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA	70
6.2	CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL DA LESÃO ESTRIATAL COM 6-OHDA	71
6.3	EXACERBAÇÃO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA VIA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA POR LPS	72
6.4	EXPRESSÃO DE FATORES A MONTANTE (UPSTREAM) DA CASCATA DO TLR4	73
7	CONCLUSÃO	75
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
9	APÊNDICE	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson é uma doença que possui expressiva morte seletiva de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNc), cuja ausência da dopamina leva aos clássicos sintomas parkinsonianos (DE VIRGILIO *et al.*, 2016).

1.1.1 HISTÓRICO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa que mais acomete os indivíduos a partir dos 65 anos de idade em todo o mundo (ficando atrás apenas da doença de Alzheimer). Sua prevalência vem crescendo em todo o mundo, conforme a população do planeta envelhece (DORSEY *et al.*, 2007). Trata-se de uma doença incapacitante, que representa um fardo econômico, social e emocional para os pacientes e aqueles que cuidam dos mesmos. A DP possui alta prevalência, e em 2021, foi estimado que mais de 6 milhões de indivíduos possuem a doença. Esse número mais que duplicou nos últimos 30 anos, e, curiosamente, homens são mais acometidos que mulheres, numa proporção de 3:2 (TOLOSA *et al.*, 2021).

A doença de Parkinson recebeu este nome pois em 1871, James Parkinson publicou um estudo intitulado “An Essay on the Shaking Palsy” onde foram descritos seis casos clínicos de homens entre 50 e 72 anos que apresentavam essa condição denominada pelo autor de “paralisia com tremores” (“*Shaking palsy*” ou “*Paralisis agitans*”) (PARKINSON, 1817). Posteriormente, a doença foi homenageada com o nome de Parkinson.

Nesse estudo, James Parkinson conceituou essa condição que acompanha a paralisia com tremor como: “movimentos de tremores involuntários, com diminuição do tono muscular, as vezes quando não estão em ação e até mesmo para o suporte, com propensão de inclinação do tronco para a frente, e passar de um ritmo de caminhada para um ritmo de corrida: os sentidos e o intelecto não são prejudicados”. Conforme a doença evolui, Parkinson notou que os tremores se tornavam difusos, a mão parava de responder apropriadamente aos comandos, a marcha dos pacientes apresentava piora, observada pela execução de passos curtos, baixa capacidade de elevação da perna, e a necessidade de assistência para evitar quedas frequentes. Além disso, James Parkinson observou outros sintomas, como a constipação (ou obstipação, que seria uma forma mais grave e crônica dessa condição), cujo paciente necessitaria de um auxílio para expelir as fezes; problemas para dormir, onde o paciente apresentava tremores frequentes, que o impossibilitava o sono contínuo; perda da capacidade de articulação oral (uma disartria, que se refere a uma dificuldade no controle dos músculos envolvidos com a fala, podendo chegar em uma anartria, que seria a condição na qual a pessoa se torna incapacitada de articular

palavras), o que ele chamou de palavras “escarças e inteligíveis”; dificuldades para a deglutição dos alimentos, devido os tremores da língua, da faringe, etc., que dificultam a mastigação e a deglutição; produção excessiva de saliva (sialorréia), com dificuldade de drenagem da saliva que surge na boca; incontinência urinária e constante exaustão. (PARKINSON, 1817 – Republicado em 2002)

Posterior à Parkinson, Jean-Martin Charcot (1825-1893), um médico francês que contribuiu muito para o conhecimento do campo da neurologia, aprimorou as descrições sintomáticas da “paralisia agitante” e passou a chamá-la de “la maladie de Parkinson” (“o Mal de Parkinson”). Nas palavras de Charcot “Para aprender a tratar uma doença, é preciso entender a reconhecê-la: o diagnóstico é o melhor triunfo no tratamento”. Nesse sentido, Charcot se aprofundou nos estudos da doença de Parkinson para diferenciar essa doença de outras doenças neurológicas (como a atrofia multisistêmica e a paralisia supranuclear) e contribuiu para o refinamento clínico e para a precisão do diagnóstico. Dessa forma, Charcot elucidou e definiu os sinais cardinais da doença de Parkinson (como tremor, bradicinesia, a rigidez e a dificuldade do equilíbrio) e contrapôs a ideia de Parkinson de que havia uma perda da força muscular. Descreveu que, na verdade, não havia fraqueza muscular, e sim uma rigidez muscular, que causava uma diminuição da habilidade de força do paciente, não pela perda de tônus, mas pela dificuldade de iniciar o movimento (TEIVE, 1998; GOETZ, 2007; PRZEDBORSKI, 2017).

Em 1893, Blocq e Marinescu observaram características parkinsonianas em um paciente com granuloma tuberculoso, que atingia a substância negra, ipsilateral ao lado afetado do corpo (BLOCQ; MARINESCU, 1893). Essa observação permitiu que em 1899 Brissaud sugerisse que a substância negra estivesse afetada na DP (BRISSAUD, 1899). Konstantin Tretiakoff (1892-1958), um neuropatologista russo, descreveu em 1919 alterações patológicas associadas a DP com a observação macroscópica de despigmentação dos neurônios que continham neuromelanina da SN e a observação microscópica da perda neuronal que foi associada com gliose e os corpos de Lewy (TRÉTIKOFF, 1919). Os corpos de Lewy foram identificados previamente, em 1913, por Fritz Heinrich Lewy, porém não foram relatados na SN (LEWY, 1913). Isso levou muitos cientistas a acreditar que a patologia estava focalizada no estriado. Apenas entre 1964-66 que estudos demonstraram que lesões mecânicas no mesencéfalo de macacos e ratos causaram depleção dopaminérgicas no estriado, e que a remoção do estriado primeiramente causava um aumento e semanas depois, uma diminuição da dopamina liberada pela SN (ANDEN *et al.*, 1964, 1965; POIRIER; SOURKES, 1965; GOLDSTEIN *et al.*, 1966; DAHLSTRÖM; FUXE, 1964; PRZEDBORSKI, 2017). O papel e o mecanismo de sinalização da dopamina foram elucidados por Carlsson e Greengard, que receberam o Nobel de fisiologia

ou medicina em 2000. O primeiro esclareceu o papel da dopamina como neurotransmissor e a sua ausência relacionada com a DP (CARLSSON, 2006), e o segundo, os mecanismos da sinalização intracelular nos neurônios e como esses processos celulares estão relacionados com a DP (GREENGARD, 2001). Ainda permanecem lacunas no entendimento da fisiopatologia da doença de Parkinson, com muito a ser desvendado.

1.1.2 SINTOMAS

Atualmente já se tem em vista a miríade de sinais e sintomas que acompanham a doença de Parkinson, e são didaticamente separadas por sinais motores e não-motores. Dentre os sinais motores ainda não citados, pode-se acrescentar: a marcha encurvada e desordenada, instabilidade postural, hipomimia (falta de expressão facial), dificuldade de olhar para cima, dificuldade em se virar na cama, hipofonia (voz cada vez mais suave) e palilalia (repetição de frases ou palavras). Dentre os sintomas não motores, podemos citar: disfunção do sistema nervoso autônomo (hipotensão ortostática, constipação e incontinência fecal, disfagia, gastroparesia, disfunção sexual, hiposmia, sialorréia [excesso de saliva], rinorréia [corrimento do muco nasal], incontinência urinária, nocturia [micção excessiva a noite] e prejuízos no controle detrusor da urina), transtornos sensoriais (sensações anormais, síndromes de dores e anosmia [perda do olfato]), transtornos do sistema tegumentar (seborreia [produção excessiva de sebo], melanomas malignos e outros cânceres de pele, erupções cutâneas, hiperidrose [produção excessiva de suor] e rubor na pele), problemas visuais (diplopia [percepção de duas imagens de um único objeto], visão embaçada e prejuízos para a discriminação de cores), fadiga, ganho ou perda de peso, cifose (curvatura da coluna típica de pacientes com DP), mudanças cognitivas (como dificuldades em tomar decisões, dificuldade em fazer múltiplas tarefas, dificuldade de retenção de memória e problemas na percepção visuoespacial), mudanças comportamentais e neuropsiquiátricas (como psicose, alucinações, alteração da personalidade, retardação psicomotora, problemas de recuperação de memória, ansiedade, depressão, apatia [perda da emoção], abulia [incapacidade de tomar decisões], bradifrenia [lentidão dos pensamentos]), e problemas do sono (ataques do sono, sonolência diurna, insônia, problemas do sono REM e síndrome da perna inquieta) (BEITZ, 2014b).

1.1.3 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico tem como base a presença dos sinais e sintomas motores (verificado pelo mnemônico TRAP – Tremor, Rigidez, Acinesia e Postura). O diagnóstico com base em sintomas é pouco eficiente, pois os sinais não motores da DP, como constipação não

são específicos para a DP, enquanto que os sinais motores se interpolam com os de outras doenças neurodegenerativas (como a demência com corpos de Lewy, a degeneração corticobasal, a atrofia de múltiplos sistemas e a paralisia supra nuclear progressiva). Dessa forma, o diagnóstico precoce é essencial para o melhor prognóstico da doença, apesar destes sinais clínicos característicos aparecem principalmente quando a DP já está instalada em fase avançada. A anamnese médica, testes terapêuticos, exames neurológicos e de imagem e análises post mortem, auxiliam na confirmação do diagnóstico clínico, que vão além da presença dos sinais motores. Uma vez que os sinais não-motores, que podem preceder os sinais motores, não são suficientes indicativos, exclusivos ou preditivos da doença, esses testes auxiliam na determinação do diagnóstico, ou pelo menos, ajudam a eliminar outras condições médicas que podem causar sintomas semelhantes.

1.1.4 FISIOPATOLOGIA

Ao dissecar o cérebro de um paciente com a doença de Parkinson é possível verificar uma extensiva morte de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, principalmente na parte compacta da substância negra (SNc, “*substantia nigra pars compacta*”), o acúmulo de emaranhados da proteína α -sinucleína (α -sin) também presentes nas inclusões eosinofílicas nos neurônios remanescentes, chamadas de neuritos ou corpúsculos de Lewy (que contém a α -sin, dentre outras proteínas), também são observados nos neurônios dopaminérgicos remanescentes (POEWE *et al.*, 2017).

Estes achados fisiopatológicos não são específicos da DP; no entanto, estas neuropatologias, somadas ao diagnóstico clínico, são específicas para o diagnóstico definitivo da DP de origem idiopática (DICKSON *et al.*, 2009; HALLIDAY *et al.*, 2011).

1.1.4.1 MORTE DE NEURÔNIOS DOPAMINÉRGICOS

Ainda não se sabe exatamente os mecanismos por detrás dos achados fisiopatológicos. Em relação a morte extensiva e seletiva dos neurônios produtores de dopamina, nos estágios iniciais da doença, essa morte ocorre na região ventrolateral da SNc, sendo que os outros neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo são resguardados (FEARNLEY; LEES, 1991; DAMIER *et al.*, 1999). Alguns estudos (DIJKSTRA *et al.*, 2014; e IACONO *et al.*, 2015) sugerem que a morte seletiva ocorre antes do estabelecimento dos sintomas motores. Para entender o motivo da morte seletiva nos neurônios dopaminérgicos da SNc há algumas hipóteses: (1) os neurônios dopaminérgicos da SNc são extensivamente grandes e ramificados, o que favorece a ocorrência de insultos ao longo da sua extensão (BOLAM; PISSADAKI, 2012;

PISSADAKI; BOLAM, 2013); (2) os neurônios dopaminérgicos da SNc contém alta concentração de neuromelanina (um subproduto da dopamina (GIBB, 1992)), e essa molécula favorece reações oxidativas e produção de espécies reativas de oxigênio (KASTNER *et al.*, 1992; ZECCA *et al.*, 2008); (3) os neurônios dopaminérgicos da parte compacta da SN possuem atividade autonômica de marca-passo, que constantemente promovem a extrusão de cálcio com gasto de energia, que ativam diversas cascatas metabólicas e podem favorecer o estresse oxidativo (SURMEIER *et al.*, 2011; JAMES SURMEIER; OBESO; HALLIDAY, 2017); (4) a dopamina, além de ser auto-oxidada a quinona (que possui alta capacidade oxidativa com potencial nocivo), possui enzimas metabólicas, como a monoamina-oxidase (a MAO, e principalmente do subtipo MAO-B), que metabolizam a dopamina por meio de reação de oxido-redução, favorecendo a ocorrência do estresse oxidativo (MOSHAROV *et al.*, 2009; LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002); (5) as mitocôndrias dos neurônios dopaminérgicos são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo (SCHAPIRA, 2008; SCHAPIRA; JENNER, 2011) e a disfunção mitocondrial pode levar a depleção lisossomal (DEHAY *et al.*, 2010). Prejuízos no sistema de autofagia lisossomal associados com o prejuízo do metabolismo de α -sin, que estimulam ainda mais a morte celular, sugerem que os sistemas fisiopatológicos da DP estariam interligados em um círculo vicioso intrínseco (POEWE *et al.*, 2017).

Especificamente o estresse oxidativo favorecido nos neurônios dopaminérgicos afetam componentes celulares, que favorecem a inflamação e a morte celular (JENNER; OLANOW, 1996). As espécies reativas causam danos no DNA, que podem levar a disfunção celular e a morte neuronal (UTTARA *et al.*, 2009). Promovem ativação de células da micróglia, que favorece a neuroinflamação (KANEKO *et al.*, 2012), ativação do fator nuclear NF- κ B (GLOIRE *et al.*, 2006), que ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β (SHAFTEL; GRIFFIN; O'BANION, 2008) e promovem a lipoperoxidação, que compromete a integridade da membrana neuronal, desregula a funcionalidade desses neurônios e culmina na neuroinflamação (LIN; BEAL, 2006).

1.1.4.2 ACÚMULO DE α -SINUCLEÍNA E PRESENÇA DE CORPOS DE LEWY

Foi observado que em todos os pacientes com DP são encontrados agregados intraneuronais de proteínas, compostos majoritariamente de α -sin (POEWE *et al.*, 2017). A função da α -sin ainda não foi completamente elucidada, mas sabe-se que é uma proteína de 140 aminoácidos que fica expressa no citosol, e, possivelmente, em mitocôndrias. A α -sin parece desempenhar um papel na exocitose das vesículas sinápticas e também desempenha a atividade de uma

chaperona (VEKRELLIS *et al.*, 2011; WALES *et al.*, 2013; BURRÉ, 2015). A α -sin é sintetizada na forma de monômeros pelo gene SNCA (do inglês “*SyNuClein Alpha*”), sendo que na DP de causa hereditária foram encontradas mutações pontuais e multiplicações deste gene, que aumentam a probabilidade de expressão e a superprodução dessa proteína. O excesso de α -sin favorece a oligomerização e produção excessiva em má-conformação, que sobrecarrega as vias proteolíticas e favorece a formação de fibrilas de α -sin (POEWE *et al.*, 2017).

A α -sin tem sua homeostase mantida principalmente pela ação de dois sistemas: o sistema ubiquitina-proteassoma e o sistema de autofagia lisossomal, sendo que esse último parece ser o mais importante para eliminar oligômeros de α -sin (XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2013). Dentro desse sistema de autofagia lisossomal, a degradação da α -sin pode ser direcionada para outros dois subsistemas: a macro-autofagia e a autofagia mediada por chaperonas (BRUNDIN *et al.*, 2008; XILOURI; BREKK; STEFANIS, 2013). Há indícios que esses dois sistemas atuam de forma compensatória entre si e que a inibição de ambos aumenta os níveis intracelulares de α -sin. Os sistemas de ubiquitina-proteassoma e de autofagia lisossomal tem sua função reduzida com o envelhecimento. Sabe-se que a senescência é o maior fator de risco para o desenvolvimento da doença de Parkinson (KAUSHIK; CUERVO, 2015). Somado a tudo isso, já foi observado que nos pacientes com DP e nos modelos genéticos de camundongos com genes envolvidos com a doença de Parkinson há redução dos níveis enzimáticos lisossomais em células da substância negra, principalmente naquelas as quais há inclusões citoplasmáticas de α -sin (CHU *et al.*, 2009). Há redução dos marcadores bioquímicos de autofagia mediados por chaperonas (ALVAREZ-ERVITI *et al.*, 2010) e acúmulo de autofagossomos ativados (ANGLADE *et al.*, 1997). Além do mais, a presença da α -sin oligomerizada parece inibir o sistema metabólico de ubiquitina-proteassoma (EMMANOUILIDOU; STEFANIS; VEKRELLIS, 2010), e parece, também, inibir o sistema de macroautofagia (WINSLOW *et al.*, 2010; TANIK *et al.*, 2013). As diferentes formas da α -sin podem reduzir a atividade da autofagia mediada por chaperonas, o que reduz ainda mais a sua metabolização (XILOURI *et al.*, 2009; MARTINEZ-VICENTE *et al.*, 2008). Por fim, também foi observado que algumas formas genéticas da DP estão associadas com a função reduzida do sistema de autofagia lisossomal, o que favorece o acúmulo dos oligômeros de α -sin (POEWE *et al.*, 2017). Portanto, o acúmulo de α -sin na DP possui diversos indícios de serem produtos da disfunção metabólica, que favorece o acúmulo e dificulta sua eliminação.

Além dos mecanismos de formação e agrupamento dos oligômeros de α -sin, há hipótese de que esses agrupamentos formam depósitos de α -sin contaminam novos neurônios por um

mecanismo semelhante a um príon (“*prion-like propagation*”). Nesse sentido, esses agregados intracelulares seriam transportados intra-axonalmente para outras regiões do cérebro, onde poderiam ser liberados para o ambiente extracelular e captados por novos neurônios adjacentes, fomentando a formação dos novos agregados de α -sin em um novo neurônio hospedeiro (ANGOT *et al.*, 2010; BRUNDIN; MELKI; KOPITO, 2010). Dentro da DP há evidências da ocorrência de disfunção mitocondrial, como um elemento crucial para a propagação da doença como um ciclo vicioso que ocorre entre o acúmulo da α -sin e a ocorrência de distúrbios na atividade das mitocôndrias, onde um exacerba o outro e vice-versa, o que favorece o acúmulo das proteínas de α -sin e os danos celulares causados pelo metabolismo energético disfuncional (SCHAPIRA, 2007; BOSE; BEAL, 2016). (**Figura 1** – extraída de POEWE *et al.*, 2017).

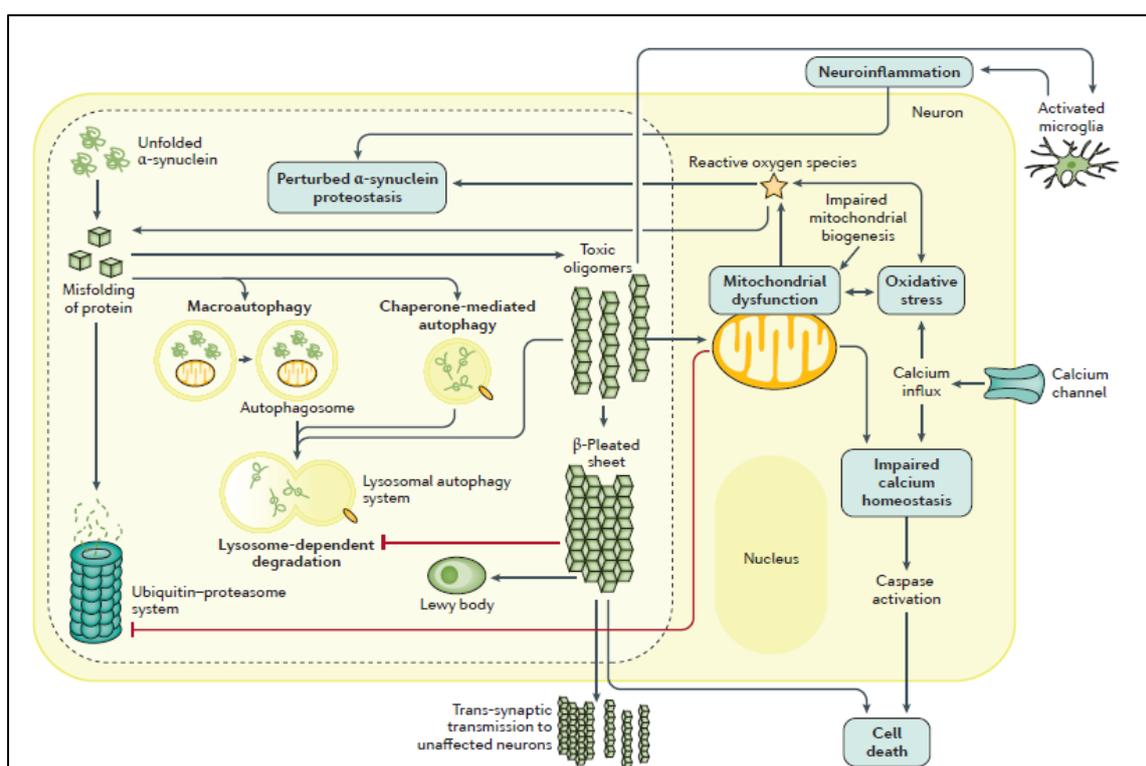


Figura 1: Mecanismos moleculares envolvidos com a patologia da doença de Parkinson. Iniciando pela α -sin em má-conformação, são formados oligômeros tóxicos, que formam estruturas em β -folha. Essas proteínas desregulariam o sistema de degradação proteica ubiquitina-proteassoma, inibiriam o sistema de autofagia lisossomal e causariam disfunção mitocondrial. Como consequência, não seria possível eliminar essa α -sin acumulada, que se depositaria nos chamados ‘corpos de Lewy’. Ao mesmo tempo, esses oligômeros acumulados prejudicariam a biogênese mitocondrial e favoreceria o estresse oxidativo, que somado ao influxo de cálcio, promoveriam a ativação de caspases e promoveriam a morte celular. Por fim, esses mecanismos ativarão células da microglia, que por sua vez, favoreceria ainda mais a neuroinflamação e a morte neuronal. Extraído de Poewe *et al.*, 2017.

1.1.4.3 NEUROINFLAMAÇÃO

Outros pontos marcantes da doença de Parkinson podem ser observados na **Figura 1**, como: a presença da microglia ativada, o estresse oxidativo, do prejuízo na homeostase do

cálcio, da ativação de caspases e da ativação de vias de morte celular programada, estimulada pelos prejuízos causados pela α -sin e pela presença dos corpos de Lewy. Estas características fisiopatológicas são fatores que contribuem para um quadro de inflamação, que posteriormente foi identificada no cérebro de pacientes com a DP (POEWE *et al.*, 2017).

Estudos com cérebros post-mortem, imagens cerebrais de pacientes e biomarcadores solúveis do plasma de pacientes com DP, mostraram que a neuroinflamação é característica marcante da doença de Parkinson (MOEHLE; WEST, 2015). Ao que tudo indica, a neuroinflamação seria um fator essencial para a patologia da DP. Porém ainda não se sabe se seria o gatilho para o desencadeamento de todas as cascatas fisiopatológicas da doença (RANSOHOFF, 2016; HIRSCH; HUNOT, 2009). Estudos de associação genômica ampla (“*genome wide association studies*”, GWAS) indicaram que genes associados com a patologia da DP codificam proteínas relacionadas com cascatas imunológicas e envolvidas na regulação da resposta imune, como o gene LRRK2 (de “*leucine-rich repeat kinase 2*”). Este gene está envolvido com o mecanismo de autofagia de células imunes, e apresenta mutação no genoma de pacientes com a forma hereditária da doença (NALLS *et al.*, 2014; SCHAPANSKY *et al.*, 2014; MA; HOVY, 2016). Estudos com pacientes e modelos experimentais de DP sugerem ativação da resposta imune inata e adaptativa promovida pela presença de agregados de α -sin no SNC (HIRSCH; HUNOT, 2009; RANSOHOFF, 2016). Inversamente, a neuroinflamação pode favorecer a presença da α -sin em uma conformação tridimensional aberrante e disfuncional (GAO; REN; ZHAO, 2008).

Em 1988, McGeer e colaboradores estudaram cérebros post-mortem de pacientes em estágios avançados de DP e identificaram células da micróglia ativadas dentro da substância negra, sinal típico de inflamação. Observaram que os cérebros com indícios de estado tardio da doença, o tecido cerebral se demonstrava com aparência esponjiforme, atrofiado e a presença de astrócitos GFAP-reativos (GFAP, “*glial fibrillary acidic protein*”) (MCGEER *et al.*, 1988). A combinação da resposta imune inata e a ativação de células microgliais são características da DP, tanto em modelos animais quanto em humanos acometidos pela doença (HIRSCH; HUNOT, 2009).

Quando reativa, a micróglia exerce efeitos tóxicos por meio da liberação de produtos derivados de oxigênio e de nitrogênio, gerados em um processo chamado de “explosão respiratória”. Este mecanismo induz na substância negra de pacientes e em modelos animais, a expressão de enzimas como a NADPH oxidase, iNOS (óxido nítrico sintase induzida), MPO (mieloperoxidase) e aumenta a concentração de radicais superóxido ($O_2^{\circ-}$) e óxido nítrico (NO) (CHOI *et al.*, 2005; KNOTT; STERN; WILKIN, 2000; PHANE HUNOT *et al.*, 1999; WU *et*

al., 2003). Foi observado aumento da concentração de íon ferro nas células da SNc de pacientes com DP (HIRSCH, 2006) e isso favorece a produção de radicais hidroxila (OH^o) por meio da reação de Fenton, o que aumenta ainda mais a capacidade danosa de efeitos tóxicos dos radicais livres.

O grupo de pesquisa de Damier observou que naturalmente há menor densidade de astrócitos que expressam glutathione peroxidase na SNc (DAMIER *et al.*, 1993). Isso poderia ser um fator de suscetibilidade para a patologia da DP, visto que os astrócitos auxiliam no metabolismo neuronal, além de tamponar radicais livres de oxigênio por meio da reação antioxidante promovida pela atividade catalítica da enzima glutathione peroxidase (HIRSCH; HUNOT, 2009; LIN *et al.*, 1993). Dessa forma, a menor disponibilidade de astrócitos com a enzima antioxidante no ambiente suscetível ao estresse oxidativo da substância negra (somado aos fatores intrínsecos desses neurônios), permite que ocorra a propagação do estresse oxidativo.

Os radicais livres ainda podem se combinar e causar efeitos nocivos em diversas proteínas, como a tirosina hidroxilase (TH, enzima do passo limitante da síntese de dopamina) (ARA *et al.*, 1998) e na α -sinucleína (PRZEDBORSKI *et al.*, 2001). As modificações na estrutura da TH promovidas pelos radicais livres estão associadas com diminuição da sua atividade enzimática, enquanto que com a α -sin, estão associadas com a potencialização da sua má-conformação, agregação e formação dos emaranhados intracelulares (ARA *et al.*, 1998; ISCHIROPOULOS, 2003). Além disso, o radical livre NO pode produzir nitritos não reativos, que podem ser utilizados como substrato para reações de nitrosilação, com auxílio da ação oxidativa da MPO (VAN DER VLIET *et al.*, 1997). Isso promove alterações estruturais em proteínas. De uma forma geral, a ativação das células da glia, a produção de radicais livres e os seus efeitos tóxicos parecem exercer os efeitos deletérios conforme a neuroinflamação persiste durante a patologia da doença de Parkinson (**Figura 3**) (HIRSCH; HUNOT, 2009).

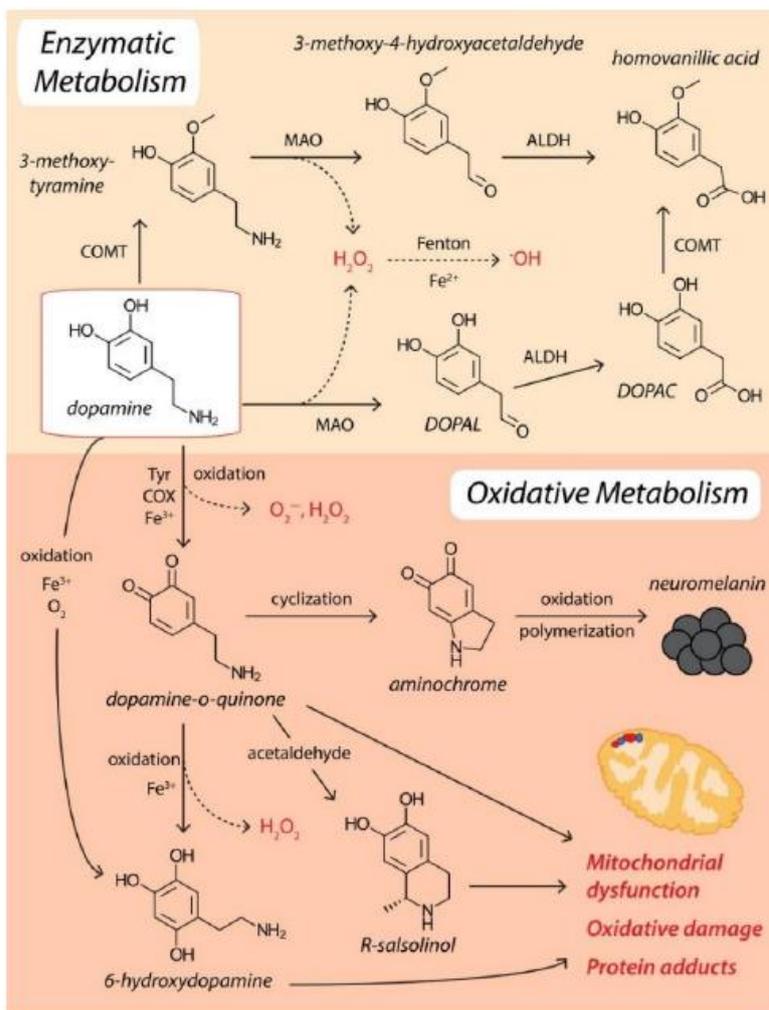


Figura 2: Mecanismos moleculares e enzimáticos da dopamina, que favorecem a produção de EROs.

Nessa figura, na parte superior, está representado o metabolismo enzimático da DA, que resulta na produção de espécies reativas. Nesse metabolismo estão envolvidos a COMT (catecol-o-metil transferase), a MAO (monoamina oxidase), a ALDH (aldeído des[h]idrogenase) e a COX (ciclooxigenase). A ação catalítica dessas enzimas resulta na produção de espécies reativas de oxigênio. Na parte inferior da figura, está representado o metabolismo auto-oxidativo da molécula de dopamina, que resulta na produção de espécies reativas citotóxicas, ao mesmo tempo que libera mais EROs. Ao final, essas moléculas produzem danos oxidativos, disfunção mitocondrial e adutos proteicos – que significa a

ligação de duas proteínas distintas, formando uma proteína só, similar ao que ocorre na oligomerização da α -sinucleína. Imagem extraída de (TRIST; HARE; DOUBLE, 2019).

Em sua forma reativa, a micróglia libera espécies reativas de oxigênio (EROs) e isso, provavelmente, estimula a angiogênese, induzindo fragilidade capilar. Simultaneamente, as EROs podem promover danos diretos na estrutura física dos capilares cerebrais, permitindo que as células periféricas adentrem no SNC. Conseqüentemente, foi observado que a doença de Parkinson tem como característica o remodelamento das interações celulares entre o parênquima cerebral e a circulação sanguínea (HIRSCH; HUNOT, 2009). Também foi observado em cérebros post-mortem de pacientes com a DP, a presença de células periféricas como linfócitos T citotóxicos (CD8+) (MCGEER *et al.*, 1988) e linfócitos T (CD4+) em quantidades superiores à cérebros saudáveis (BROCHARD *et al.*, 2009). Farkas e colegas (2000) observaram mudanças patológicas na microanatomia dos capilares cerebrais de pacientes com DP (FARKAS *et al.*, 2000). Esses dados evidenciam que células periféricas adentram o parênquima cerebral durante o processo neurodegenerativo da DP, visto que parece haver

mudanças fisiológicas na barreira hemato-encefálica (BHE) no cérebro de pacientes com a DP (HIRSCH; HUNOT, 2009). Portanto, é entendido que na DP ocorre infiltração de células imunes periféricas no SNC, favorecendo a resposta inflamatória local.

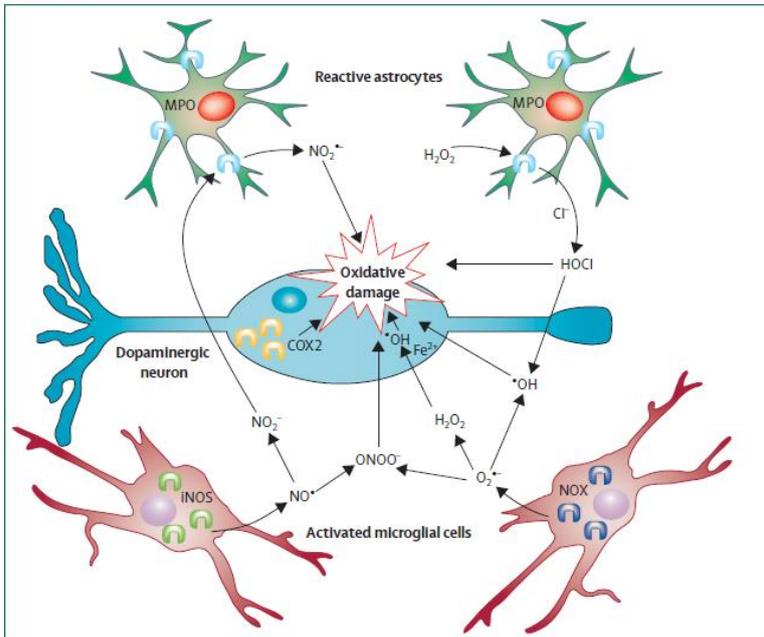


Figura 3: Mecanismos imunológico-oxidativo presente na neuroinflamação da doença de Parkinson. Uma das ferramentas utilizadas por células imunes é a produção e liberação de espécies reativas de oxigênio e radicais livres de nitrogênio. Essas moléculas radiculares possuem alta capacidade de danos oxidativos, dentre eles a lipoperoxidação, um mecanismo altamente citotóxico. Imagem extraída de (HIRSCH; HUNOT, 2009).

No cérebro de pacientes com DP, foi observado aumento no estriado da concentração de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), microglobulina β 2, fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), TGF- β 1, e as interleucinas IL-1 β , IL-6 e IL-2 (MOGI *et al.*, 1994a, 1994b, 1995a, 1995b, 1995c, 1996, 2000). Já na substância negra, foi observada a presença de IL-1 β , interferon γ (IFN- γ) e TNF- α (PHANE HUNOT *et al.*, 1999). O receptor de TNF- α é encontrado em neurônios dopaminérgicos (BOKA *et al.*, 1994) e a expressão desse receptor é aumentada em neurônios dopaminérgicos de pacientes com a DP (MOGI *et al.*, 2000). Citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-1 β e IFN- γ podem estimular enzimas pró-inflamatórias, como a forma induzível da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) (BOJE; ARORA, 1992; CHAO *et al.*, 1992) e a ciclooxigenase 2 (COX-2) (VANE; BAKHLE; BOTTING, 1998). Estas estimulam a produção de EROS em níveis tóxicos. Outras enzimas como a NADPH oxidase e a mieloperoxidase (MPO) estão envolvidas em processos inflamatórios mediados por estresse oxidativo e também se encontram aumentadas na patologia da DP (CHOI *et al.*, 2005; KNOTT; STERN; WILKIN, 2000; WU *et al.*, 2003).

1.2 DOPAMINA

1.2.1 DOPAMINA: SÍNTESE, METABOLISMO E AÇÕES BIOQUÍMICAS

A dopamina (DA, IUPAC: 3,4-dihidroxi-feniletanamina; também chamada de, 2- (3,4-dihidroxifenil) etilamina; 3,4-dihidroxifenetilamina; 3-hidroxitiramina) é uma molécula da classe das catecolaminas, que atua como neurotransmissor. O grupo catecol (3,4-diidroxibenzeno, um anel benzênico com duas hidroxilas em posição orto) é conectado a uma amina primária por uma cadeia etil e essa estrutura forma a molécula de DA. Ela ativa os receptores dopaminérgicos localizados em neurônios pré- e pós-sinápticos e desencadeia uma resposta intracelular, que é propagada pelos sistemas dopaminérgicos. A DA regula processos complexos como o humor, a atenção, o comportamento motivacional e o movimento, sendo entendida como salientadora de processos neurofisiológicos (GOLAN *et al.*, 2009).

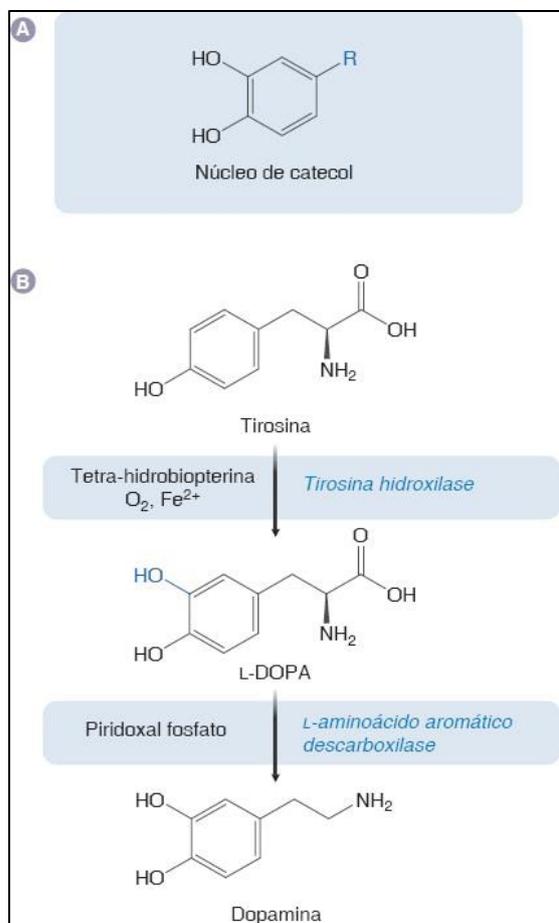


Figura 4: Biossíntese da dopamina. A biossíntese da dopamina se inicia com o aminoácido não-essencial Tirosina, que é convertida a L-DOPA pela ação catalítica da Tirosina Hidroxilase (TH). A L-DOPA é convertida a dopamina, por meio da ação enzimática da descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC). Imagem extraída de Golan *et. al.* – terceira edição, 2009.

A síntese endógena da dopamina se inicia com o aminoácido tirosina (oriundo da dieta ou sintetizado no fígado a partir da fenilalanina) que se liga à enzima TH que catalisa a oxidação do 3º carbono do anel benzeno da tirosina, por uma reação de oxidação do co-fator tetraidrobiopterina, que se transforma em diidrobiopterina, cedendo a hidroxila que vai se ligar em orto no anel benzeno, promovendo a conversão da tirosina em L-DOPA (L-3,4-diidroxifenilalanina ou levodopa). A L-DOPA prossegue na via de síntese da dopamina se

ligando à enzima descarboxilase de aminoácidos aromáticos (AADC), que catalisa a clivagem do carbono α da cadeia lateral, com auxílio do co-fator fosfato de piridoxal, que auxilia na liberação de um dióxido de carbono, formando então a dopamina (DA). A AADC é expressa também em outras células não dopaminérgicas, produtoras de catecolaminas, mas também em

neurônios não-catecolaminérgicos, como o serotoninérgico, e também em células da glia (GOLAN *et al.*, 2009) (**Figura 5** – Extraído de Golan et. al. – terceira edição, 2009).

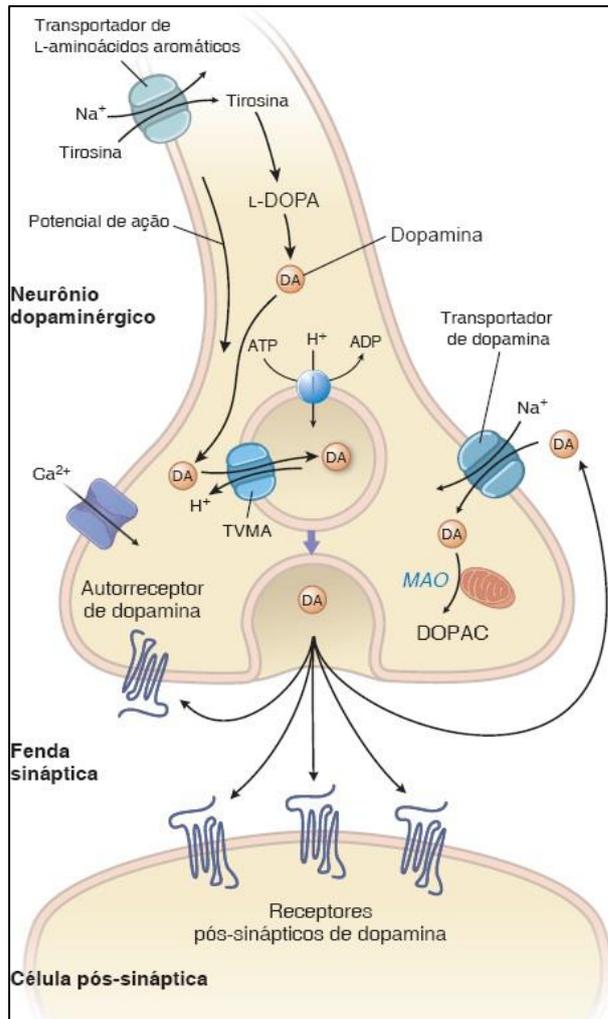


Figura 5: Metabolismo dopaminérgico: síntese, armazenamento, exocitose, metabolismo e ligantes extracelulares. A síntese da dopamina se inicia com o co-transporte de tirosina e Na^+ para o neurônio dopaminérgico. No citosol, a tirosina é convertida a L-DOPA e posteriormente a dopamina. Então, a dopamina é captada para dentro de vesículas de armazenamento, por meio de um transporte que utiliza o gradiente de prótons como força motriz. Dentro da vesícula sináptica, a DA fica armazenada até que surja um potencial de ação excitatório, que promove a sua exocitose para a fenda sináptica. Ali, a DA pode se ligar em receptores pré- e pós-sinápticos, como também pode ser recaptada para dentro do neurônio dopaminérgico por meio da ação da proteína de transporte de dopamina. Dentro do neurônio, a DA pode ser metabolizada ou pode ser recaptada para uma vesícula sináptica para ser novamente liberada frente potencial de ação excitatório. Imagem extraída de Golan et. al. – terceira edição, 2009.

Todo o processo de síntese endógena da dopamina acontece no citoplasma do neurônio dopaminérgico. Uma vez que a dopamina foi sintetizada, ela será levada o interior de vesículas de armazenamento por meio da proteína transportadora de

dopamina vesicular (VMAT), que utiliza a força motriz do gradiente de prótons promovido pela H^+ -ATPase. O interior da vesícula tem pH ácido permite que a VMAT atue como um antiportador de prótons, deslocando os H^+ a favor do gradiente, enquanto efetua o transporte simultâneo da DA para dentro da vesícula. Uma vez dentro da vesícula, a dopamina está pronta para sofrer exocitose quando chegar um potencial de ação estimulatório no terminal sináptico. Na fenda sináptica, a dopamina poderá exercer seus efeitos ao se ligar a receptores dopaminérgicos (pré- e pós-sinápticos), ser degradada ou ser recaptada para o neurônio dopaminérgico (GOLAN *et al.*, 2009). Ao exercer seus efeitos extracelulares, a DA pode ser recaptada para o neurônio pré-sináptico pelo transportador de dopamina (DAT). A DAT acopla o transporte da DA com o co-transporte de sódio (Na^+) - promovido por uma Na^+/K^+ -ATPase. Dentro do neurônio pré-sináptico a DA pode ainda ser metabolizada pela enzima monoamina oxidase (MAO), que apresenta duas isoformas a MAO-A e a MAO-B. A MAO-B é a

responsável pela maior parte do metabolismo da DA. Além disso, a DA pode ser recaptada pela VMAT para dentro da vesícula de armazenamento, para ser novamente liberada na fenda sináptica (GOLAN *et al.*, 2009). Ao se difundir na fenda sináptica, a DA pode ser metabolizada pela enzima catecol-o-metil transferase (COMT). No sistema nervoso central a COMT é expressa por neurônios e degrada a DA, junto com a MAO, formando o metabólito ácido homovanílico (HVA), que pode ser excretado pela urina (Figura 6 - GOLAN *et al.*, 2009).

Os receptores de dopamina são acoplados a proteína G, e existem 5 subtipos que pertencem em 2 famílias, as famílias D1 e D2 (**Figura 6**). Os receptores da família D1 incluem os subtipos D1 e D5, excitatórios acoplados a proteína G_s. Eles estimulam a produção de AMP cíclico, estimulam a hidrólise de fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂ - Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), formando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP₃), que por sua vez ativam a fosfoquinase C (PKC) e a mobilização de cálcio (Ca²⁺) intracelular, promovendo a propagação do sinal excitatório dentro da célula. A família D2 inclui os subtipos D2, D3 e D4, e são inibitórios acoplados à proteína G_i. A ativação desses receptores da família D2 estimula a proteína G_i a inibir a síntese de AMPc, diminuindo as correntes de Ca²⁺ intracelulares e aumentando as correntes de potássio (K⁺), que então inibem cascatas de sinalização intracelulares. Tanto os receptores D1, quanto D2 são expressos no estriado (núcleo caudado e putâmem) e são responsáveis pelo controle da alça motora dos núcleos da base (GOLAN *et al.*, 2009).

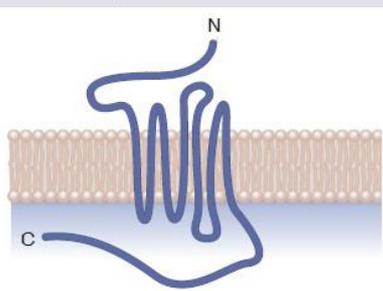
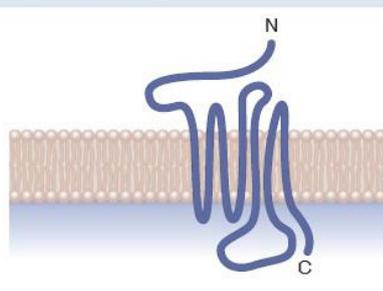
	Família do receptor D1		Família do receptor D2		
Estrutura esquemática					
Sistemas de segundos mensageiros	<ul style="list-style-type: none"> ↑ AMPc (via G_s) ↑ Hidrólise do PIP₂ Mobilização do Ca²⁺ (via IP₃) Ativação da PKC 		<ul style="list-style-type: none"> ↓ AMPc (via G_i) ↑ Correntes de K⁺ ↓ Correntes de Ca²⁺ reguladas por voltagem 		
Distribuição no SNC	D1	D5	D2	D3	D4
	Estriado Neocórtex	Hipocampo Hipotálamo	Estriado Substância negra Hipófise	Tubérculo olfatório <i>Nucleus accumbens</i> Hipotálamo	Córtex frontal Bulbo Mesencéfalo

Figura 6: Subtipos de receptores dopaminérgicos, agrupados nas famílias D1 e D2. Os receptores D1 e D5 são do tipo excitatórios, e os receptores D2, D3 e D4 são inibitórios. Notar que os receptores D1 são expressos no Estriado, e que os receptores D2 são expressos no Estriado e na Substância Negra. Imagem extraída de Golan et. al. – terceira edição, 2009.

Figura 8: Alças locomotoras do SNC. Na figura, temos representadas as vias direta, indireta e hiperdireta. São componentes dessas vias: o córtex, a Substância Negra (*pars compacta*) (SNc), o estriado, o Globo Pálido externo (GPe), o núcleo subtalâmico (NST), o Globo Pálido interno (GPi), o Tálamo e o córtex motor. A via direta é: córtex → estriado → GPi → tálamo → córtex motor. A via indireta é: córtex → estriado → GPe → NST → GPi → tálamo → córtex motor. A via hiperdireta é: córtex → NST → GPi → tálamo → córtex motor. Em todas as vias, a dopamina atua favorecendo e facilitando o movimento. Figura criada com BioRender pela autora, com base no capítulo 14 do livro “Neuroscience – exploring the brain” dos autores BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007, 3ª edição.

A via nigroestriatal apresenta 3 divisões: a via hiperdireta, a via indireta e a via direta. Em todas essas vias, os componentes comuns entre elas são: o córtex, o estriado, a SNc, o globo pálido (interno e externo, GPi e GPe), o núcleo subtalâmico (NST), o tálamo e o córtex motor. O córtex, o núcleo subtalâmico e o tálamo possuem neurônios glutamatérgicos; o estriado e o globo pálido possuem neurônios GABAérgicos. A substância negra possui neurônios dopaminérgicos (BEAR; CONNORS; PARADISO, 2007).

A via hiperdireta não conta com envolvimento dopaminérgico e desestimula o movimento, ligando o córtex ao NST, qativando o GPi, inibindo o tálamo, que não ativa o córtex motor.

A **via direta (GO)** começa no córtex, que ativa o estriado. A transmissão da informação pela via direta é iniciada pela ativação dos receptores D1 no estriado. Daí, existe a projeção sucessiva de neurônios GABAérgicos (inibitórios) para o GPi/SNr (parte reticulada da SN), ocorrendo o silenciamento da atividade tônica dos neurônios inibitórios. Em seguida, há a projeção para o tálamo. Dessa forma, o *input* excitatório proveniente do córtex (glutamatérgico) irá desinibir os neurônios talâmicos, que por sua vez estimulam o córtex. Esta via resulta na facilitação da atividade muscular, por estimulação da via corticoespinhal lateral pelo córtex.

A **via indireta (NoGO)**, começa no córtex, que ativa o estriado, que libera GABA na fenda sináptica do GPe. Ele inibe o NST, que não estimula o GPi. O GPi, então, não inibe o tálamo, que não ativa o córtex motor. A via indireta envolve a passagem de informação pelo GPe, seguindo para o GPi/SNr e núcleos subtalâmicos, sendo ativada pela estimulação dos recetores D2 no estriado. O GPe envia um sinal inibitório para o núcleo subtalâmico (STN), que por sua vez possui uma ligação excitatória com o complexo GPi/SNr. Desta forma, a ativação da via indireta leva ao aumento do *output* pelo GPi, inibindo o tálamo, resultando num movimento menor e mais lento pela diminuição da estimulação do córtex. Já a SNc, libera dopamina, que por meio dos receptores D2, inibe o estriado, dessa forma, perde-se a alça inibitória do estriado, que dessa forma, não inibe o GPe, que inibe o NST. O NST, não ativa o GPi, que não inibe o tálamo e então ativa o córtex motor. Isso resulta na ativação do movimento.

Portanto, tanto na via direta, quanto na indireta, a dopamina atua facilitando o movimento (**Figura 8**) (CALABRESI *et al.*, 2014).

Em suma, a DA auxilia na facilitação do movimento, e a ausência da DA, como na DP, faz com que a atividade da via indireta seja exacerbada, promovendo o aparecimento dos sintomas motores observados nos pacientes. A suplementação da dopamina com a administração do seu precursor, L-DOPA – tem como objetivo suprir a ausência da conexão nigroestriatal e então, suprir o prejuízo dessa falta de DA na alça motora (KWON *et al.*, 2022).

1.3 TRATAMENTO DA DOENÇA DE PARKINSON

A DOPA foi sintetizada pela primeira vez em 1911 na forma de uma mistura racêmica (FUNK, 1911), e só em 1921, o isômero L-DOPA foi sintetizado quimicamente (WASER; LEWANDOWSKI, 1921). No entanto, apenas quando Arvid Carlsson e colaboradores (1957) demonstraram que a L-DOPA é efetiva em restaurar os movimentos perdidos com a doença de Parkinson, foi então que o precursor da dopamina, se tornou o tratamento medicamentoso padrão-ouro da DP (CARLSSON; LINDQVIST; MAGNUSSON, 1957). A L-DOPA é administrada junto com um inibidor da AADC (Benserazida ou a carbidopa), visto que a administração conjunta do inibidor da AADC permite que menores doses de L-DOPA sejam administradas. O bloqueio da metabolização aumenta em até quatro vezes sua efetividade no SNC e, doses menores, propiciam redução da incidência dos seus efeitos adversos (FAHN, 2006). Como por exemplo, esses coadjuvantes do tratamento da DP reduzem os efeitos gastrointestinais, que por meio da sinalização periférica da dopamina atuam na área postrema, que não é protegida pela BHE, ativando o centro do vômito (FAHN, 2006).

A L-DOPA é administrada em humanos por via oral e preferencialmente em jejum, pois necessita da ação do transportador de aminoácidos neutros para adentrar a BHE. As presenças de outros aminoácidos da alimentação competem pelo transporte, o que diminui sua biodisponibilidade no sítio de ação (GOLAN *et al.*, 2009). Em ratos e camundongos, ela pode ser administrada intraperitonealmente, para que adentre a veia mesentérica e profunda sistemicamente até alcançar o SNC. A L-DOPA, então adentra o SNC com auxílio do transportador de L-aminoácidos neutros (LNAA) e pode ser captada pelos neurônios dopaminérgicos remanescentes por afinidade pelo DAT. Dentro do neurônio dopaminérgico, a L-DOPA pode ser metabolizada em DA e liberada na fenda sináptica, para que exerça seus efeitos atenuando os prejuízos motores dos pacientes com DP (GOLAN *et al.*, 2009).

Muitos pacientes melhoram seus sintomas motores com o uso da combinação de L-DOPA com benserazida, tanto que o tratamento medicamentoso é uma ferramenta utilizada

para a confirmação do diagnóstico da doença de Parkinson, conforme a administração procede uma melhora nos sintomas motores (MARSDEN; FAHN, 1981). Com o tratamento da DP usando a L-DOPA por via oral, os sintomas de rigidez dos movimentos e bradicinesia demonstram significativa melhora. O tremor de repouso, por outro lado, possui uma resposta mais variável e incompleta frente a L-DOPA. Outros sintomas ainda são pouco responsivos ao tratamento, como a instabilidade postural, a micrografia e os distúrbios da fala. O reconhecimento dos benefícios e dos limites do tratamento com o medicamento é importante para os pacientes e médicos, para estabelecerem metas realistas para o tratamento (FAHN, 2006). Nos primeiros anos de tratamento os efeitos da L-DOPA são duradouros, mesmo com a droga tendo uma curta meia-vida plasmática de pouco menos de 30 minutos (TOLOSA *et al.*, 1975).

1.3.1 EFEITOS COLATERAIS DA L-DOPA

Conforme o uso prolongado da L-DOPA, o tratamento apresentará alguns problemas como flutuações “ligado-desligado” (“*on/off*”), efeitos de “wearing off” e movimentos anormais involuntários, chamados de discinesia induzida por L-DOPA (LID, de “*L-DOPA-induced dyskinesia*”) (JANKOVIC, 2008). Essas complicações motoras afetam 75% dos pacientes após 6 anos de uso da L-DOPA (FAHN, 2006). O uso prolongado da L-DOPA leva a um estreitamento da janela terapêutica, fazendo com que o paciente precise cada vez mais de quantidades maiores do fármaco para que exerça seu efeito (chamado de “*wearing off*”). Pode desencadear flutuações em sua função motora, onde ocorrem períodos que a droga funciona (períodos “ligado”, “*on*”), e períodos que a droga não promove efeito (períodos “desligado”, “*off*”), com congelamento e rigidez dos movimentos. O período “desligado” tende a acontecer quando a droga já está sendo eliminada do plasma (PANDEY; SRIVANITCHAPOOM, 2017). Ambos efeitos induzem o paciente a aumentar a dose e a frequência da administração da droga, podendo favorecer ainda mais a ocorrência da manifestação discinética (GOLAN *et al.*, 2009).

A LID também é chamada de “discinesia de pico de dose” pois ocorre quando a droga está em seu pico de concentração plasmática (CARTA *et al.*, 2017a). O primeiro relato da LID foi em um grupo de 28 pacientes estudados pelo grupo de Cotzias (1969), onde além dessa complicação motora causada pelo tratamento crônico, também foram relatados sintomas mentais como irritabilidade, raiva, hostilidade, paranoia, insônia e distúrbios do sono (COTZIAS; PAPAVALIOU; GELLENE, 1969). A LID foi descrita em pacientes humanos sendo do tipo coreia (movimentos irregulares repetitivos), com mioclonia (contração leve dos músculos), hemibalística (movimento unilateral rápido, de caráter arremessador) e distônica

(contração muscular forte involuntária e de longa duração). Esses sintomas são referidos como movimentos anormais involuntários, ou AIMs (de “*abnormal involuntary movements*”), que compõem os sintomas da de LID. No relato do grupo de Cotzias, foi mencionado que os pacientes não apresentavam esses efeitos nas primeiras semanas de uso e que a redução da dose diminuía a apresentação dos efeitos motores. Dentro de 5 a 10 anos de tratamento com L-DOPA, quase todos os pacientes tratados cronicamente com L-DOPA vão desenvolver movimentos involuntários aleatórios (TURCANO *et al.*, 2018). A longo prazo, essas discinesias tendem a se agravar e o fenômeno da intermitência da ação da droga (liga/desliga) passam a ser quase sempre presentes, ou seja, o manejo do tratamento torna-se realmente muito difícil (GOLAN *et al.*, 2009).

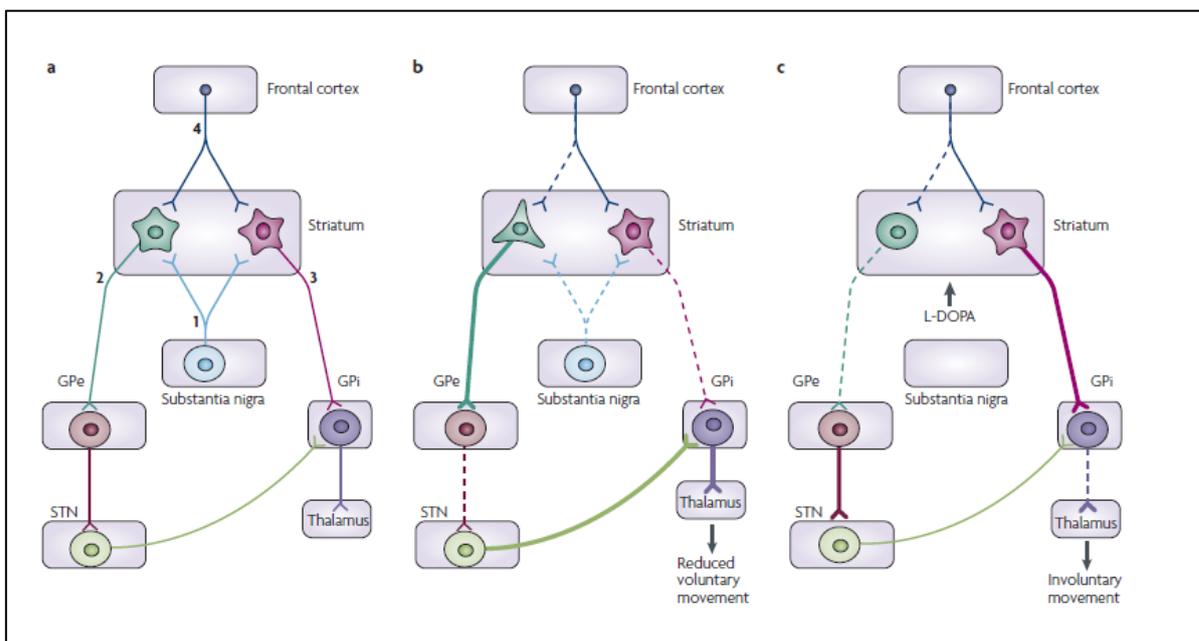


Figura 9: Modelo clássico das mudanças fisiológicas na alça motora dos núcleos da base que ocorrem na LID. Em (1) estão representadas as aferências dopaminérgicas que tem origem na parte compacta da Substância nigra. Essas aferências chegam no estriado, e compõem as vias indireta e direta da alça motora dos gânglios da base. A via indireta (2) possui receptores dopaminérgicos D2 inibitórios, e a via direta (3) possui receptores dopaminérgicos D1 excitatórios. A via indireta (2) se projeta para o globo pálido externo (GPe), onde projeta sinapses GABAérgicas para o núcleo subtalâmico (STN). Os neurônios do STN são glutamatérgicos e se projetam para o globo pálido interno (GPi), onde projetam neurônios GABAérgicos para o tálamo. A via direta (3) possui projeções que saem do estriado e vão diretamente para GPi, que por sua vez, também se projetam para o tálamo. O estriado possui outra aferência, além das dopaminérgicas da SNc, que possuem origem no córtex frontal e são de origem glutamatérgica. Em (a) está apresentada a condição sadia das conexões dos núcleos da base. Em (b) é apresentada a versão clássica da DP com a perda das aferências dopaminérgicas da SNc (1), que levaria a hiperatividade da via indireta e hipoatividade da via direta. O número de espinhos dendríticos dos neurônios espinhosos médios do estriado também estariam diminuídos, e a via cortical de aferência glutamatérgica para o estriado (4) também estaria alterada. Em (c) está demonstrada a administração da L-DOPA causando alterações opostas as da DP, com hiperatividade da via direta e hipoatividade da via indireta. Imagem extraída de JENNER, 2008.

Ao contrário do que é observado na doença de Parkinson, foi observado que há maior prevalência da LID em mulheres (WARREN OLANOW *et al.*, 2013; ZAPPIA *et al.*, 2005). A

discinesia envolve diversas regiões no cérebro como o estriado, a aferência entre globo pálido e o núcleo subtalâmico, o córtex motor, o tálamo e o cerebelo (YANG *et al.*, 2021). Há algumas hipóteses para a ocorrência desses efeitos adversos das flutuações motoras e da apresentação da discinesia. Uma delas diz respeito a progressiva morte dos neurônios dopaminérgicos, que continua mesmo com o tratamento medicamentoso dos sintomas da DP (**Figura 9** - JENNER, 2008). Neste caso, os terminais dopaminérgicos remanescentes se tornam cada vez mais escassos. Ocorrem mudanças bioquímicas e fisiológicas nas conexões dos núcleos da base, com mudanças nos mecanismos de transdução de sinais e na neurotransmissão dos neurônios dopaminérgicos (PISANU *et al.*, 2018). A morte seletiva de neurônios dopaminérgicos causa uma menor liberação dessa neurotransmissão em seus terminais sinápticos, que por sua vez, causa uma hipersensibilização nos receptores dopaminérgicos nos neurônios pós-sinápticos, que ficam hiper-responsivos frente uma quantidade cada vez menor do seu ligante, a DA (CARTA; BEZARD, 2011). Os receptores D1 sensibilizados causam uma hiperativação da via de sinalização do AMPc, ativando de maneira exacerbada proteínas metabólicas, como a PKA e a DARPP-32 (FEYDER; BONITO-OLIVA; FISONE, 2011; GERFEN *et al.*, 1990; PICCONI *et al.*, 2003; SANTINI *et al.*, 2007). Consequentemente, outras vias de sinalização são exacerbadamente ativadas, como a via da ERK (uma quinase regulada por sinal extracelular, “*extracellular signal-regulated kinase*”), envolvida com a transcrição de genes e produção de outras proteínas (FASANO *et al.*, 2010; SANTINI *et al.*, 2007). Os receptores D1 são altamente expressos nos neurônios de projeção estriatais que fazem aferência com os núcleos da base em sua alça motora, o que acarreta uma estimulação forte da via direta por meio da sinalização de AMPc (PICCONI *et al.*, 2003; SANTINI *et al.*, 2007).

A hiperestimulação dos receptores do estriado também promovem mudanças intracelulares, como o aumento da expressão de alguns genes que se relacionam com o receptor dopaminérgico D1, que tem sido observado estar aumentado no citoplasma de pacientes com DP tratados com L-DOPA por conta da ativação do mecanismo de internalização dos receptores (BEZARD; BROTHIE; GROSS, 2001; MURIEL *et al.*, 1999). Além disso, o tratamento prolongado com L-DOPA continua desenvolvendo a hipersensibilização dos receptores D1 da via direta ao longo do tempo (GERFEN *et al.*, 1990), observado nos pacientes que desenvolvem a LID (BEZARD; BROTHIE; GROSS, 2001). Apesar dessas mudanças envolvendo os receptores D1, não foram observadas mudanças em relação aos receptores D2 (GUIGONI *et al.*, 2005). Porém ainda é debatido se os receptores D2 são relevantes para a fisiopatologia da discinesia (KWON *et al.*, 2022). É possível que receptores D3 (pertencentes à família de D2) estejam envolvidos na LID, de forma que estejam com a expressão aumentada no estriado

(BÉZARD *et al.*, 2003; GUIGONI *et al.*, 2005), visto que a administração de antagonistas D3 reduzem a LID (BÉZARD *et al.*, 2003).

A LID também envolve outros neurônios, como os serotoninérgicos (5-HT) e os noradrenérgicos (NA), que possuem a enzima AADC (PAGANO; YOUSAF; POLITIS, 2017), capazes de converter L-DOPA em DA, de forma que esses neurônios conseguem armazenar a DA sintetizada. Auto receptores D2 regulam a taxa de liberação de dopamina nos neurônios produtores de DA, porém esses receptores não são expressos nos neurônios de 5-HT, então, é difícil para que esses neurônios serotoninérgicos façam a captação, armazenamento e liberação correta da L-DOPA que é convertida em dopamina. Isso também significa que nas fendas sinápticas que fazem aferências com o estriado se tornam cada vez mais difícil de controlar a dopamina no terminal sináptico (**Figura 10**) (CARTA *et al.*, 2017a; LINDGREN *et al.*, 2010).

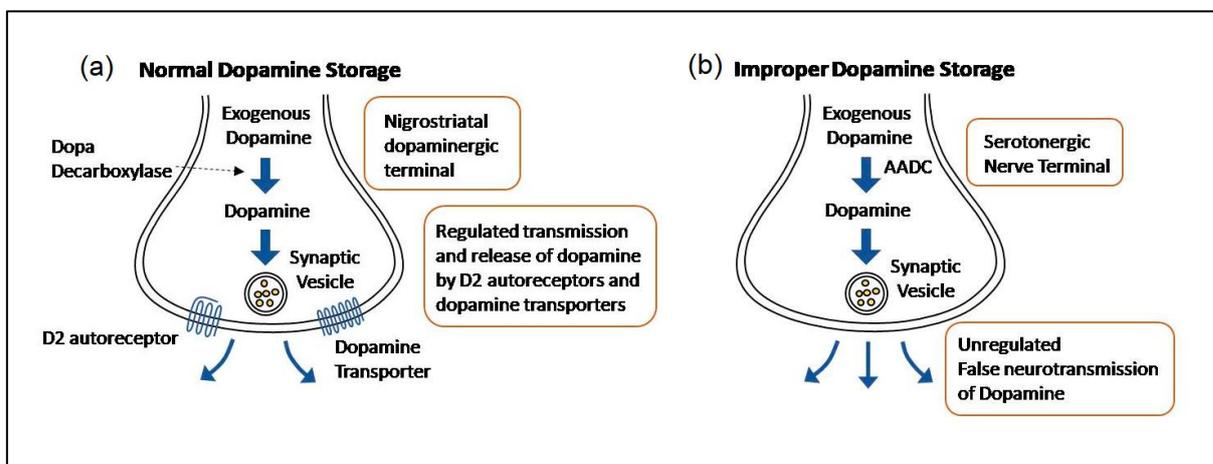


Figura 10: Figura representativa do mecanismo de liberação anormal de dopamina por terminais sinápticos de neurônios não-dopaminérgicos. Em (a) está representado o armazenamento normal da dopamina em um neurônio dopaminérgico. Nesse neurônio, a dopamina fica armazenada em vesículas sinápticas para serem liberadas frente estímulo excitatório. Para a finalização do efeito da DA na fenda sináptica, um dos mecanismos de finalização envolve a recaptação da DA por meio do transportador DAT. O auto receptor D2 também auxilia a normalizar a liberação da dopamina para níveis adequados. Em (b) temos a situação da sinalização inapropriada de dopamina, onde um neurônio de 5-HT, por exemplo, libera a DA frente estímulos, mas não possui mecanismo para recaptação ou normalização dessa sinalização. Figura extraída de Kwon *et al.*, 2022.

Os neurônios de 5-HT, que não possuem a maquinaria necessária para controlar a liberação de DA (**Figura 10**) (BANDOPADHYAY *et al.*, 2022), promovem a liberação anormal desse neurotransmissor, frente a propagação de sinal excitatório do neurônio serotoninérgico, que promove a liberação intermitente da DA, ativando seus receptores dopaminérgicos, de maneira anormal (CARTA; BEZARD, 2011). Como resultado, a cada estímulo, uma quantidade excessiva de dopamina é liberada na fenda sináptica em contato com o estriado, causando uma hiperestimulação dos receptores dopaminérgicos (YHR *et al.*, 1969). Este fato parece ser relevante na fisiopatologia da LID, pois: (1) a administração de

agonistas seletivos para auto receptores inibitórios de 5-HT (5-HT_{1A} e 5-HT_{1B}) promove uma redução da LID em modelos de discinesia induzida por L-DOPA em roedores e primatas não humanos (CARTA *et al.*, 2007; MUÑOZ *et al.*, 2009); e (2) conforme ocorre a progressão da doença e a maior morte dos neurônios dopaminérgico, aumenta a proporção de sinapses serotoninérgicas no estriado em relação as sinapses dopaminérgicas (POLITIS *et al.*, 2010, 2011).

Similarmente aos neurônios de 5-HT, os neurônios produtores de NA também possuem a enzima AADC que sintetiza a DA, o que contribui mais ainda para as flutuações dos níveis de DA no estriado (KEMPADOO *et al.*, 2016). Não só os neurônios serotoninérgicos e noradrenérgicos parecem estar envolvidos com a discinesia, mas há indícios que os neurônios glutamatérgicos desempenhem um papel na LID (KWON *et al.*, 2022). Há receptores glutamatérgicos (NMDA [N-metil-D-aspartato] e AMPA [α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-izoxazol propiônico [ácido]]) no estriado (SGAMBATO-FAURE; CENCI, 2012) e a administração de L-DOPA estimula a liberação de Glutamato (CALABRESI *et al.*, 2014). A administração de antagonistas glutamatérgicos, como a amantadina, e outros de receptores AMPA, demonstrou diminuir a LID (KWON *et al.*, 2022; LINDENBACH *et al.*, 2016).

Há, ainda, outras hipóteses sobre a manifestação da LID. Uma diz respeito ao tempo de doença, com a discinesia aparecendo de forma inerente ao tratamento, mas conforme a DP progride (CILIA *et al.*, 2014). Outra diz que as modificações bioquímicas nos terminais sinápticos dopaminérgicos, causadas pelo tratamento crônico com a L-DOPA, promovem alterações na taxa e padrão de disparo de neurônios estriatais (YANG *et al.*, 2021). As flutuações constantes na concentração da droga desregulam os mecanismos reguladores da sinalização e da cessação do sinal da dopamina, alterando a expressão dos receptores pós-sinápticos. Isso promove uma adaptação pós-sináptica, que alteram a sensibilidade do neurônio pós-sináptico frente a dopamina liberada. Isso pode favorecer ainda mais as flutuações motoras de “liga-desliga” no paciente. Somado a tudo isso, há evidências fortes da ocorrência de neuroinflamação nas áreas depletadas de dopamina, promovida pelo tratamento crônico e intermitente com a L-DOPA, que ocorre simultaneamente a ocorrência das discinesias (DELBEL *et al.*, 2016a).

1.4 NEUROINFLAMAÇÃO E O TRATAMENTO CRÔNICO COM L-DOPA

A L-DOPA é o tratamento padrão-ouro da DP e sua administração a longo prazo propicia o desenvolvimento de complicações motoras (JANKOVIC, 2008; JANKOVIC;

POEWE, 2012; RASCOL; BROOKS; KORCZYN, 2000). O tratamento não impede o progresso da doença e realça ainda mais as respostas neuroinflamatórias (PISANU *et al.*, 2018)

Os mecanismos que contribuem para a neuroinflamação da LID, podem envolver células imunes como a micróglia residente do SNC, assim como seus mensageiros autócrinos e parácrinos, como as citocinas. A micróglia possui função sentinela no SNC, percebendo as neurotransmissões e regulando neuromoduladores metabólicos (como o cálcio) (CARTA *et al.*, 2017b; POCOCK; KETTENMANN, 2007; TREMBLAY; LOWERY; MAJEWSKA, 2010). Os neurônios possuem receptores de citocinas em suas membranas extracelulares, que geram respostas intracelulares. A micróglia cronicamente ativada pode ser responsável pelas respostas maladaptativas dos neurônios dopaminérgicos à perda da DA e ao tratamento crônico com L-DOPA (PISANU *et al.*, 2018). Barnum e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento crônico com L-DOPA induziu um aumento da expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β , sendo que a administração de corticosterona nos ratos lesionados com 6-OHDA e tratados cronicamente com L-DOPA, não só reduziu os níveis de expressão dessa citocina, como atenuou o desenvolvimento dos movimentos discinéticos nesses animais (BARNUM *et al.*, 2008). Essa redução dos AIMs também foi proporcionada pela administração de um antagonista do receptor da IL-1, demonstrando que a comunicação de citocinas liberadas pela micróglia e a ativação dos receptores de citocinas em neurônios é uma conversa complexa que parece estar ocorrendo durante o desenvolvimento da LID.

Nosso grupo de pesquisa vem investigando a neuroinflamação que ocorre durante a LID, com observações de aumento de microglíose e astrogliose no estriado de ratos discinéticos (BORTOLANZA *et al.*, 2015a), aumento de expressão de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1 β) (BORTOLANZA *et al.*, 2018; DOS SANTOS PEREIRA *et al.*, 2022), aumento da síntese enzimática de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (que desencadeiam respostas inflamatórias), promovidas por iNOS (BORTOLANZA *et al.*, 2015a), nNOS (PADOVAN-NETO *et al.*, 2009, 2011) e COX-2 (BORTOLANZA *et al.*, 2015b). A inibição da via de sinalização da NO demonstrou uma melhora clínica dos sintomas da LID em ratos (BORTOLANZA *et al.*, 2015b), no entanto, apesar das concentrações de nNOS aumentarem após a lesão com 6-OHDA, parece que não se altera após o tratamento crônico com L-DOPA (PADOVAN-NETO *et al.*, 2015).

Na mesma linha de pesquisa correlacionando neuroinflamação com a discinesia induzida por L-DOPA, Mulas e colegas (2016) administraram intraperitonealmente LPS em ratos, antes de iniciar o tratamento crônico com a L-DOPA, e obtiveram uma intensificação da manifestação comportamental da LID nesses animais. Foi induzido aumento de citocinas pró-

inamatórias (TNF- α), microgliose e aumento da expressão de iNOS no estriado desses ratos (MULAS *et al.*, 2016). A administração de LPS antes de iniciar o tratamento crônico com L-DOPA exacerbou a discinesia e também os marcadores neuroinflamatórios. Este efeito nos levou a investigar essa via metabólica mais a fundo.

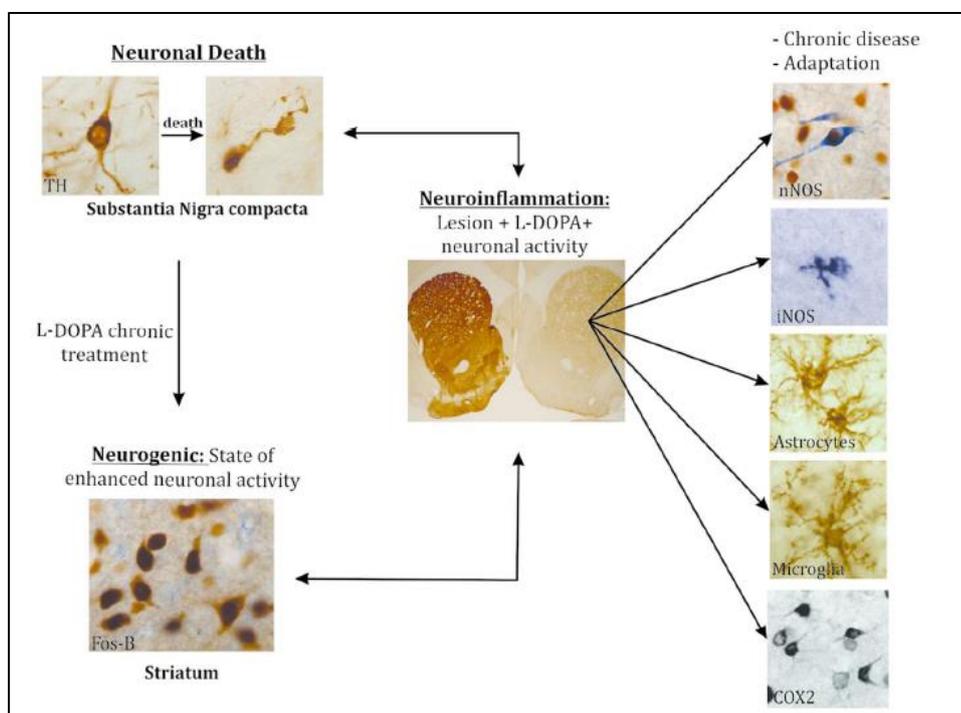


Figura 11: Mecanismos neuropatológicos da neuroinflamação da LID. Utilizando modelos experimentais de roedores com a DP, foi observado inicialmente que a morte dos neurônios dopaminérgicos contribui para a neuroinflamação, que também se mantém sustentada durante a administração crônica da L-DOPA. Durante o período de tratamento onde ocorre a manifestação dos AIMs, também são observados outros marcos neuroinflamatórios, como aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível e neuronal (iNOS e nNOS, respectivamente), gliose de astrócitos e micróglia e aumento da expressão da ciclooxigenase 2 (COX-2). Figura extraída de DEL-BEL *et al.*, 2016.

1.5 NEUROINFLAMAÇÃO E TLR4

1.5.1 O QUE É O RECEPTOR TOLL-LIKE 4

Os receptores Toll foram primeiramente descobertos em moscas-da-fruta (*Drosophila melanogaster*). Neste modelo, a ativação do receptor Toll provoca a maturação embrionário na mosca e também ativa vias de produção de peptídeos antifúngicos (ANDERSON; BOKLA; NISSLEIN-VOLHARD, 1985; ANDERSON; JIIRGENS; NISSLEIN-VOLHARD, 1985). Em 1985 os pesquisadores que descobriram os receptores Toll deram esse nome de origem alemã, e sua tradução para o português seria algo como “fantástico, estranho e incrível” (GAY; GANGLOFF, 2007). Nesses trabalhos de Anderson, foram identificados 10 genes responsáveis pela produção de tais proteínas Toll e mutações pontuais nesses genes, transformavam as

proteínas incapazes de diferenciar elementos padrões no eixo dorsoventral do embrião da mosca e isso era letal.

Em 1988, ainda estudando a mosca-da-fruta, o grupo de Hashimoto determinou a sequência genética dos receptores Toll e identificou uma estrutura tripartite contendo arranjos em ‘*tandem*’ (conceito genético que significa arranjos contendo padrões de repetição sequencial de bases nitrogenadas) de um ‘*motif*’ (uma região de grande importância na proteína) rica em leucina. Essa sequência rica em leucina possui alta probabilidade de formar uma hélice transmembrana e um domínio C-terminal (HASHIMOTO; HUDSON; ANDERSON, 1988). Já em 1991, foi descoberto que esse domínio C-terminal estava relacionado com o receptor de interleucinas do tipo 1 (IL-1R) (GAY; KEITH, 1991; SCHNEIDER *et al.*, 1991). Agora esse domínio C-terminal fora chamado de domínio do receptor Toll-interleucina (TIR, de “*Toll-interleukin receptor domain*”), e foi observado não estar apenas envolvido no desenvolvimento do embrião de *Drosophila*, mas também na geração de respostas imunológicas a infecções no organismo humano (GAY; GANGLOFF, 2007). Em 1998, foram identificados 10 receptores em vertebrados com alta homologia aos receptores Toll dos insetos, com domínios extracelulares e domínios intracelulares TIR parecidos. Estes receberam esse nome de receptores semelhantes a Toll, TLRs (de “**Toll-like Receptor**”) (ROCK *et al.*, 1998).

Diferentemente dos receptores tipicamente estudados, como aqueles associados à proteína G ou aqueles tirosina-quinase, o domínio intracelular citoplasmático dos TLRs não possui atividade enzimática. Ao invés disso, esse domínio interno estimula dimerização e oligomerização de outras proteínas, como as que possuem o domínio TIR, e formam uma armadilha intracelular para fomentar o recrutamento de outras proteínas “*downstream*” nessa via de sinalização (GAY; GANGLOFF, 2007). Como pode ser observada a estrutura do TLR4 na **Figura 12**, o ectodomínio (o domínio extracelular, marcado pelas alças retorcidas) da proteína é conectada ao domínio TIR intracelular por meio de uma única estrutura de α -hélice transmembrana. Conforme a ligação do ligante extracelular, que pode ser o LPS, acoplado a outras proteínas, a estrutura do receptor TLR4 sofre mudanças conformacionais, alterando a conformação do domínio intracelular e desencadeando o recrutamento das outras proteínas intracelulares que compõem a cascata de sinalização.

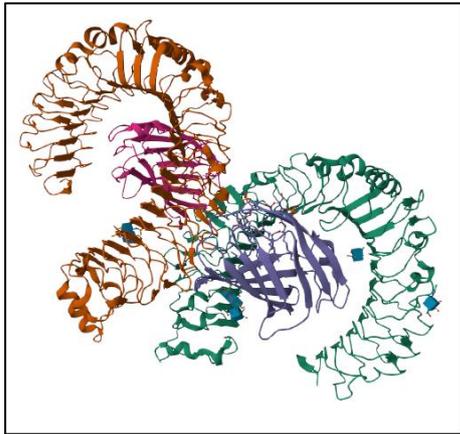


Figura 12: Estrutura do receptor TLR4 dimerizado e acoplado a duas moléculas de LPS, cada. A alça retorcida é o ectodomínio e a região curta é a C-terminal intracelular. Estrutura obtida por cristalografia de raio-x. PDB: 3VQ2.

1.5.2 SINALIZAÇÃO DE TLR4 – CONCEITOS GERAIS

No ser humano, a ativação dos receptores TLR4 desencadeia a ativação de fatores de transcrição e a produção de diversos intermediários inflamatórios como citocinas e quimiocinas. Ainda em meados de 1998, foi demonstrada a importância dos receptores TLRs no acoplamento da imunidade inata com a imunidade adaptativa e no reconhecimento de subprodutos microbianos no organismo, com o papel dos TLR4 de sentinela. O trabalho de Medzhitov e colegas demonstrou que a ativação da via de sinalização do TLR4 é importante para a síntese de moléculas co-estimulatórias requeridas para a ativação de linfócitos T quando expostos a um antígeno (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). E em seguida, foi demonstrado que é necessário o LPS como co-estimulador para iniciar a sinalização celular da imunidade adaptativa, por meio da sinalização de TLR4 (POLTORAK *et al.*, 1998). Esses conceitos foram padronizados em 1989 por Janeway Jr, com o que ele chamou de “o segredinho dos imunologistas”. Até então já bem conhecido de que as respostas imunológicas adaptativas só eram produzidas experimentalmente se houvesse um extrato microbiano (que teria o antígeno microbiano, como LPS, por exemplo) para ser apresentado para o sistema imunológico, junto com o antígeno de interesse em questão para a produção de anticorpos contra esse segundo antígeno. Foi Janeway, então, que conceituou algo que já era utilizado despropositadamente, ao introduzir o conhecimento de receptores de reconhecimento de padrões, os PRRs (de “*pattern recognitions receptors*”) (JANEWAY, 1989), que sem saber, conceituou o papel que os TLRs desempenham nas respostas imunes, conceito este que seria depois concretizado por Beutler e Hoffman, laureados com o Nobel de Fisiologia de 2011 (VOLCHENKOV *et al.*, 2012). O conceito do uso de um antígeno bacteriano para iniciar uma resposta inata já era usado há muito tempo, como por exemplo, pelo uso do adjuvante completo de Freund (PEARSON; WOOD, 1959), mas foi só depois que Janeway padronizou este conceito, ele se tornou normatizado para a iniciação da resposta inata para o desenvolvimento da resposta adaptativa. Dessa forma, juntando todos esses conhecimentos, a sinalização da via ancestral de TLR4 foi entendida como um mecanismo padrão para iniciação

de uma resposta inata que permite ser convertida em resposta adaptativa (perpetuada em uma inflamatória) (GAY; GANGLOFF, 2007).

Então, os TLRs que hoje são reconhecidos como receptores de reconhecimento de padrões moleculares, respondem a moléculas específicas. O TLR4 pode ser ativado por meio de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, como o LPS) ou padrões moleculares associados a danos celulares (DAMPs). O lipopolissacarídeo (LPS) é uma molécula que faz parte da constituição da parede celular de bactérias gram-negativas, como a *Escherichia coli*, e é o principal agonista dos TLR4 (GAY; GANGLOFF, 2007). Um grupo de pesquisadores do Japão implantou modificações no gene de TLR4 em camundongos, e verificou que os mesmos não eram mais responsivos ao LPS e não desenvolviam a reação inflamatória frente estímulo de choque séptico (TAKEUCHI *et al.*, 1999). Isso demonstrou que o LPS é um ligante de TLR4 e que essa ligação é fundamental para o desencadeamento de uma resposta imune no organismo dos seres vivos.

Periféricamente, a sinalização dos receptores *Toll-like 4* induzem moléculas essenciais para a promoção da resposta imune adaptativa, como as moléculas CD80 e CD86. Essas moléculas são expressas na superfície celular de células dendríticas e macrófagos (ambas são células imunes periféricas apresentadoras de antígeno profissionais, APCs, de “*antigen presenting cells*”), frente estimulação do TLR4 com o LPS. Essas moléculas sinalizadoras, junto com os antígenos microbianos sendo expressos via proteínas do macrocomplexo de histocompatibilidade do tipo II (MHC II), ativam os linfócitos T CD4+. Para que isso aconteça, essas APCs devem migrar até o linfonodo mais próximo para que encontrem uma célula T CD4+ circulante, e forneçam a informação da presença do patógeno (ou o LPS), apresentando o antígeno e fazendo uma ligação das suas moléculas sinalizadoras com seus respectivos receptores localizados na membrana do Linfócito T CD4+. Elucida-se, assim, a ação do TLR4 como uma peça-chave para a imunidade inata e também para a imunidade adaptativa. (JANEWAY JR *et al.*, 2007).

Extracelularmente, a sinalização de TLR4 conta com a ligação de um complexo de proteínas, contando com a proteína de ligação ao LPS (LBP, de “*LPS binding protein*”) e a proteína receptora CD14. A proteína CD14 é um receptor que existe em duas formas: solúvel ou associada a membrana plasmática de APCs. O TLR4 se liga ao complexo LPS:LBP:CD14 por meio de uma região rica em leucina no domínio extracelular de CD14. Quando o TLR4 se liga ao complexo LPS:LBP:CD14, ele ativa uma cascata de sinalização intracelular, que resulta na ativação de fatores de transcrição, como o NF- κ B (de “*Nuclear Factor kappa B*”). O NF- κ B, por sua vez, ativa a transcrição de genes relacionados com a resposta imunológica, como

citocinas e quimiocinas (JANEWAY JR *et al.*, 2007). Os receptores Toll sinalizam a ativação de NF- κ B por meio de uma via ancestral que parece ser similar na maioria dos organismos multicelulares (GAY; GANGLOFF, 2007).

1.5.3 SINALIZAÇÃO DE TLR4 – CONCEITOS GERAIS

A ligação extracelular do complexo ao receptor TLR4 induz uma mudança conformacional na proteína receptora de membrana, que induz a porção TIR a se ligar e ativar uma proteína adaptadora, chamada de proteína 88 de resposta primária à diferenciação mieloide (MyD88, de “*myeloid differentiation primary response protein 88*”), uma molécula adaptadora essencial para as vias de sinalização tanto dos receptores TLRs, quanto dos IL-1R. A proteína MyD88 também possui um domínio TIR em uma extremidade, e na sua outra extremidade possui um domínio de intermediação de interações proteína-proteína, chamado de “domínio de morte” (SUZUKI; SUZUKI; YEH, 2002). Este “domínio de morte” possui 120 aminoácidos e é composto por 6 pacotes de dobras em α -hélice (ARAVIND; DIXIT; KOONIN, 1999; FESIK, 2000). Ele recebe esse nome pois foi primeiramente identificada em proteínas relacionadas com apoptose e a morte celular programada (FESIK, 2000). Por meio do domínio de morte, o MyD88 interage com outra proteína chamada IRAK (uma quinase associada ao receptor de interleucina 1), por meio de um outro domínio da morte localizado nela (SUZUKI; SUZUKI; YEH, 2002). Essa interação promove a ativação da quinase (IRAK), que se autofosforila e se desliga de MyD88 (JANSSENS; BEYART, 2003; KOLLEWE *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2002). Após a autofosforilação em múltiplos sítios, IRAK dissociada pode interagir com TRAF6. A proteína TRAF6 possui um domínio anelar que atua como uma ligase de ubiquitina E3, e interage com o complexo conjugado com ubiquitina. Isso resulta na síntese de uma poliubiquitina ligada por meio de lisina (DENG *et al.*, 2000; WOUFF *et al.*, 2004). A ativação de TRAF6 promove uma oligomerização por meio do seu terminal-C, que quando conjugado com ubiquitina pode ativar o próximo complexo trimérico (TAK/TAB) por meio de uma ligação não-covalente (KANAYAMA *et al.*, 2004).

O TRAF6 permite a ativação de TAK1 (quinase 1 transformadora do fator de crescimento ativado em beta), que se oligomeriza, formando o complexo 1. A TAK é uma proteína quinase membro da família da MAP quinase quinase quinase (MAPKKK, proteína associada a microtúbulo) (SHIM *et al.*, 2005), que fica ativa por meio da ligação do TRAF6 (fator 6 associado ao receptor de TNF), com auxílio das moléculas adaptadoras (TAB2 e TAB3, proteínas de ligação ao TAK) (WANG *et al.*, 2001), compondo o complexo 2. A ativação do complexo 2 leva a fosforilação de uma I κ K (inibidor de NF- κ B, o fator nuclear kappa B), por

meio da fosforilação promovida pela quinase TAK1. A IκK é composta por IκKa e IκKb (WANG *et al.*, 2001), que por sua vez, fosforilam a IκKB, marcando-a como alvo para o proteassoma. A proteína IκKB é uma quinase inibitória, que fica complexada com a membrana plasmática em sua porção citosólica e, quando inativa, permanece ligada a NF-κB. Quando IκKB é ativada por fosforilação, esta segue para degradação, enquanto libera NF-κB ativada para o citosol. Quando ativada, NF-κB então se direciona para o núcleo da célula e se liga a sua região promotora, promovendo, por fim, a transcrição de genes e a produção de proteínas relacionadas com a resposta imunológica adaptativa, como as citocinas (p. ex., TNFα) (GAY; GANGLOFF, 2007; JANEWAY JR *et al.*, 2007). Esses mecanismos intracelulares podem ser observados na **Figura 12**, a seguir.

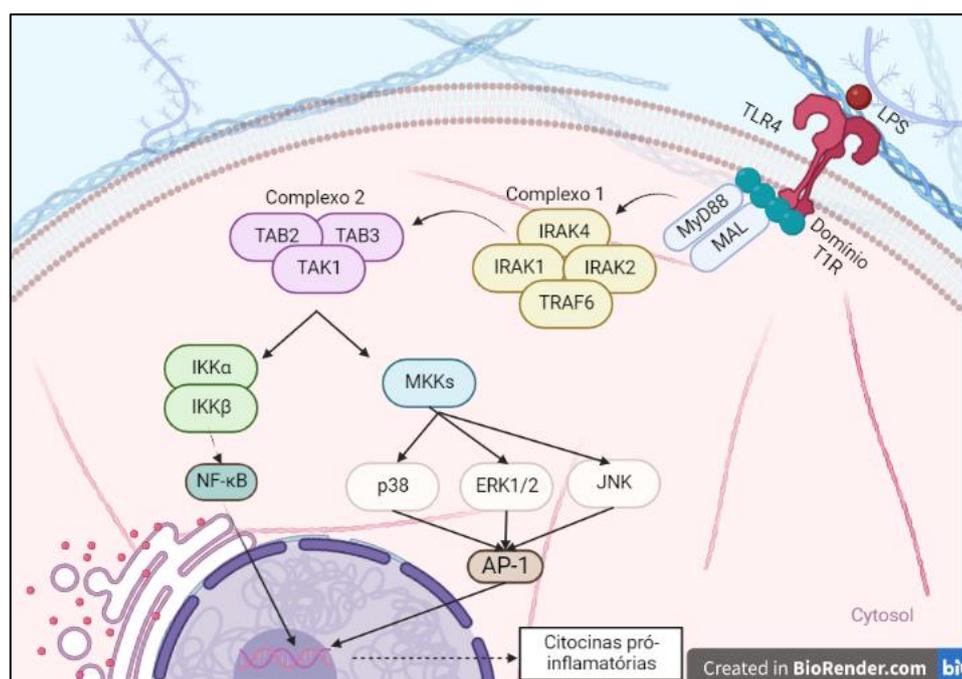


Figura 12: Via de sinalização do TLR4. Nesta figura temos o receptor TLR4 que necessita do ligante LPS e da molécula adaptadora MyD88 para se dimerizar e ativar o complexo 1. O complexo 1, por sua vez, ativa o complexo 2, que ativa a dimerização das IKKs (α e β) e a ativação das MKKs. Estas últimas resultam, por fim, na ativação de fatores de transcrição citosólicos, que quando ativados, migram para o núcleo para incentivar a transcrição de seus respectivos genes, a produzir o RNA responsável pela síntese de citocinas pró-inflamatórias. Imagem criada com base no trabalho de MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016.

A proteína TAK1 também é capaz de ativar outro ramo da via de sinalização do TLR4, mediada pela quinase Jun N-terminal (JNK) e o fator de transcrição AP-1 (proteína 1 de ativação nuclear) (GAY; GANGLOFF, 2007).

1.5.4 SINALIZAÇÃO DE TLR4 – SNC

Durante a inflamação periférica, os leucócitos ativados pelo LPS podem migrar para o SNC e contribuir para uma neuroinflamação, seguida de perda neuronal (COLLINS *et al.*,

2012). No SNC, neurônios e astrócitos podem detectar as infecções periféricas por mecanismos dependentes de TLR4 (GARCÍA BUENO *et al.*, 2016). No SNC, o TLR4 é expresso em diversas células, como a micróglia (LEHNARDT *et al.*, 2003), os astrócitos (JOU *et al.*, 2006), oligodendrócitos (KIGERL *et al.*, 2007), neurônios (TANG *et al.*, 2008) e células do endotélio vascular (NAGYOSZI *et al.*, 2010).

A ativação de receptores TLR4 no SNC pode ocorrer por diversos mecanismos não excludentes entre si, que Bueno e colaboradores (2016) enumeram: (1) Leucócitos circulantes que expressam TLR4 podem adentrar o SNC e liberar moléculas pró-inflamatórias capazes de exercer efeitos e ativar regiões específicas do cérebro; (2) A ativação pode ocorrer diretamente nos órgãos circumventriculares e outras estruturas, como o plexo coróide e as leptomeninges; (3) a ativação por ser direta, expressados em células endoteliais e perivasculares (como os podócitos dos astrócitos), que formam a barreira hemato-encefálica; e, (4) os TLR4 podem ser ativados em neurônios, micróglia e astrócitos localizados ao redor da microvasculatura cerebral (GARCÍA BUENO *et al.*, 2016). Foi observado, ainda, que a sinalização de TLR4 em neurônios e astrócitos incubados com LPS, induz uma resposta inflamatória no endotélio cerebral, que resulta na transmigração de neutrófilos (LEOW-DYKE *et al.*, 2012).

1.5.4.1 SINALIZAÇÃO DE TLR4 NA DOENÇA DE PARKINSON

No contexto da patologia da DP, a ativação de TLR4 pode implicar em excitotoxicidade glutamatérgica por meio da hiper-ativação de receptores NMDA, após exposição ao LPS (GLEZER *et al.*, 2003). *In vitro*, a micróglia, que expressa TLR4, é altamente responsiva ao LPS (OLSON; MILLER, 2004). Além disso, a ativação de TLR4 em células da glia poderia influenciar a neurotransmissão serotoninérgica, inibindo a síntese de 5-HT, e que isso também resultaria em excitotoxicidade no tecido cerebral (O'CONNOR *et al.*, 2008). Panaro e colegas (2008) observaram que há um aumento de TLR4 em células da micróglia em modelos animais e em pacientes com a DP (PANARO *et al.*, 2008). Em camundongos expostos ao modelo de lesão dopaminérgica com a toxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), o TLR4 parece mediar a morte desses neurônios dopaminérgicos, visto que a deficiência de TLR4 pareceu proteger parcialmente os camundongos dessa lesão (NOELKER *et al.*, 2013) Ao mesmo tempo, a micróglia parece exercer um papel protetor, ao promover o 'clearance' de α -sin em má-conformação, sendo que em modelos experimentais com roedores, a ausência do TLR4 diminuiu o 'clearance' de α -sin pela micróglia (FELLNER *et al.*, 2013; STEFANOVA *et al.*, 2011). Em uma outra abordagem experimental, a ativação de TLR4 em neurônios e em células da micróglia, estimulou a produção de TNF- α , e este, por sua vez, demonstrou efeito

deletério sob neurônios dopaminérgicos (BORRAJO *et al.*, 2014; FELLNER *et al.*, 2013; NEVES *et al.*, 2015).

Molteni e colaboradores, por sua vez, relativizam esses dados, visto que a ativação de TLR4 em células da micróglia, pode induzir a ativação da micróglia para um fenótipo defensivo, com o objetivo de restaurar a homeostase (MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016). No entanto, em diversas condições patológicas, como na LID, a exposição persistente a sinais de perigo (como PAMPs e DAMPs), pode causar ativação aberrante de células da glia (como observado por (BORTOLANZA *et al.*, 2015a; CARTA *et al.*, 2017a; DEL-BEL *et al.*, 2016a), com produção de mediadores pró-inflamatórios (DOS SANTOS PEREIRA *et al.*, 2022; JUNIOR *et al.*, 2020) que resultaria em uma disfunção dos neurônios estriatais (MOLTENI; GEMMA; ROSSETTI, 2016).

Dessa forma, como Mulas e colegas (2016) observaram que o LPS intensifica a manifestação da discinesia em ratos hemiparkinsonianos (MULAS *et al.*, 2016). Como nosso grupo de pesquisa já observou que a LID possui diversos componentes inflamatórios, o objetivo deste estudo é investigar se a LID, exacerbada pelo LPS, conta com o envolvimento da sinalização de TLR4 no modelo de camundongos hemiparkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA.

2 HIPÓTESE

A discinesia induzida por L-DOPA apresenta componentes neuroinflamatórios e o TLR4 pode desempenhar papel na neuroinflamação presente. A discinesia induzida por L-DOPA envolve a sinalização de TLR4. A LID será exacerbada pelo tratamento com o ligante de receptor TLR4 LPS (MULAS *et al.*, 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O estudo analisa o envolvimento de componentes da sinalização inflamatória da cascata de receptores de TLR4 em modelo experimental de doença de Parkinson em camundongos, após o tratamento crônico com L-DOPA e desenvolvimento de discinesia, na presença ou não de estímulo induzido por LPS.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar a dose de LPS que promove resposta inflamatória. Administrar diferentes doses de LPS i.p. em camundongos controles analisando efeito na locomoção e na temperatura corporal do animal, este último indicador da resposta inflamatória.
2. Determinar se a inflamação induzida pelo LPS exagera a discinesia induzida por L-DOPA (15 dias de aplicação) em camundongos lesionados com 6-OHDA.
 - a. Avaliar a manifestação comportamental da discinesia induzida por L-DOPA ao longo do tratamento crônico com a L-DOPA;
 - b. Verificar se o LPS afeta o tratamento com L-DOPA, analisando a locomoção dos animais usando o actímetro fotoelétrico.
3. Determinar o grau da lesão promovida pela 6-OHDA na via nigroestriatal, por meio da marcação da enzima tirosina-hidroxilase por imunohistoquímica, analisando secções de substância negra. Verificar se o grau da lesão é correlacionado com a manifestação da discinesia.
4. Analisar componentes da cascata de sinalização do TLR4, para verificar se (i) o LPS modifica a discinesia induzida por L-DOPA e se (ii) ocorre mudanças nos receptores TLR4 e a proteína adaptadora MyD88 (western blot) no estriado dorsolateral dos camundongos, de animais controle, submetidos à lesão dopaminérgica (com leão unilateral total ou parcial) e tratados com L-DOPA, que receberam ou não LPS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

Foram utilizados camundongos C57/Black (machos, com 6 semanas de idade, pesando de 15 a 28g), providos pelo Biotério Central do campus da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto. Os camundongos foram alocados em grupos de até 10 por caixa e mantidos à temperatura constante ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) e em ciclo de claro-escuro de 12h de duração cada (início às 6:00h e fim às 18:00h), com água e comida *ad libitum*. Os experimentos foram realizados seguindo as normas para cuidado e uso de animais de laboratório do COBEA. Todos os procedimentos foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP (CEUA nº 2020.1.561.58.6). Todos os procedimentos experimentais já se encontravam padronizados pelo Laboratório de Neurofisiologia Molecular do Departamento de Biologia Básica e Oral da FORP, sob responsabilidade da Prof.^a Elaine Aparecida Del-Bel Guimarães.

4.2 DROGAS UTILIZADAS

DROGA	FÓRMULA MOLECULAR	PESO MOLECULAR (g/mol)	DOSE	DILUENTE	VIA ADM DE
Tribromoetanol	$\text{Br}_3\text{C}-\text{CH}_2\text{OH}$	282,76	0,25 g/kg	Salina 0,9%	i.p.
6-Hidroxi-dopamina (6-OHDA)	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3$	169,18	1,6 g/kg (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	Salina 0,9%, com 0,02% de ácido ascórbico	Intraestriatal
Amoxicilina triidratada	$\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$	365,38	5 mg/mL ad libitum	Água	Oral
Apomorfina	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$	267,32	0,5 mg/kg	Salina 0,9%	s.c.
Levodopa (L-DOPA)	$\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_4$	197,19	25 mg/kg	Salina 0,9%, com 10mg/kg de Benserazida	i.p.
Lipopolissacarídeo (LPS)	$\text{C}_{175}\text{H}_{317}\text{N}_5\text{O}_{101}\text{P}_6$	4293	0,05; 0,1; 0,2; 0,5 e 2,0 mg/kg	Salina 0,9%	i.p.

Tabela 1: Drogas utilizadas em experimentação ao longo do trabalho.

4.3 LESÃO INTRAESTRIATAL – CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Com o auxílio da Técnica do laboratório Célia Aparecida da Silva, foi realizada a cirurgia estereotáxica nos camundongos que atingiram o peso mínimo de 22g (**Figura 11**). Para isso, utilizamos coordenadas estereotáxicas para o encéfalo de camundongos utilizando o atlas de Paxinos e Franklin, partindo do bregma de cada animal como o ponto zero e localizando o estriado dorsolateral pelas coordenadas: Anteroposterior (AP) +0,5mm; Latero-Lateral (LL) - 2,3mm e Dorso-Ventral (DV), sendo DV_1 -3,0mm e DV_2 -3,9mm. Os animais foram profundamente anestesiados com Tribromoetanol (i.p., 250 mg/kg) e posicionados no aparelho estereotáxico (David-Kopf, modelo 957). Em ambos os pontos (DV_1 e DV_2) foi perfundida a

droga indutora da lesão 6-hidroxidopamina (6-OHDA, a $10\mu\text{g}/\mu\text{L}$, contendo 0,02% de ácido ascórbico, diluídos em salina 0,9%) à uma velocidade de $0,5\mu\text{L}/\text{minuto}$, tomando-se o cuidado de esperar 4 minutos entre uma injeção, antes da retirada da cânula, a fim de evitar o extravasamento da droga.

A 6-OHDA possui semelhança estrutural suficiente com a dopamina para ser reconhecida pelo transportador de membrana da dopamina, dessa forma ela é reconhecida e captada por neurônios dopaminérgicos. A toxina pouco ultrapassa a barreira hematoencefálica e por isso deve ser injetada diretamente no cérebro do animal para exercer seus efeitos nocivos (UNGERSTEDT, 1968). Como é injetada no estriado dorsolateral, ela promove danos oxidativos retrógrados até o núcleo da substância negra. Dessa forma, a 6-OHDA mimetiza a lesão dopaminérgica da doença de Parkinson, de forma que possamos reproduzir os efeitos do tratamento no modelo animal. A 6-OHDA é muito instável e por isso ela é feita com 0,02% de ácido ascórbico, que é um antioxidante, e, portanto, oxidando-se preferencialmente, de forma a manter a 6-OHDA íntegra até que ela exerça seus efeitos danosos no cérebro do animal. A degeneração retrógrada causada pela 6-OHDA demora de 1 a 3 semanas para se estabelecer completamente (PRZEDBORSKI *et al.*, 1995). A injeção com 6-OHDA promove uma diminuição dos níveis de dopamina no estriado de forma dose-dependente (LEE; SAUERI; BJT, 1996) e seus efeitos deletérios ocorrem pela produção de espécies reativas de oxigênio (PRZEDBORSKI; ISCHIROPOULOS, 2005), pelo auto oxidação (HEIKKILA; COHEN, 1972; SOTO-OTERO *et al.*, 2000), pela ativação de vias metabólicas das caspases (HANROTT *et al.*, 2008) ou pela ativação da via metabólica da JNK (CROCKER *et al.*, 2011).

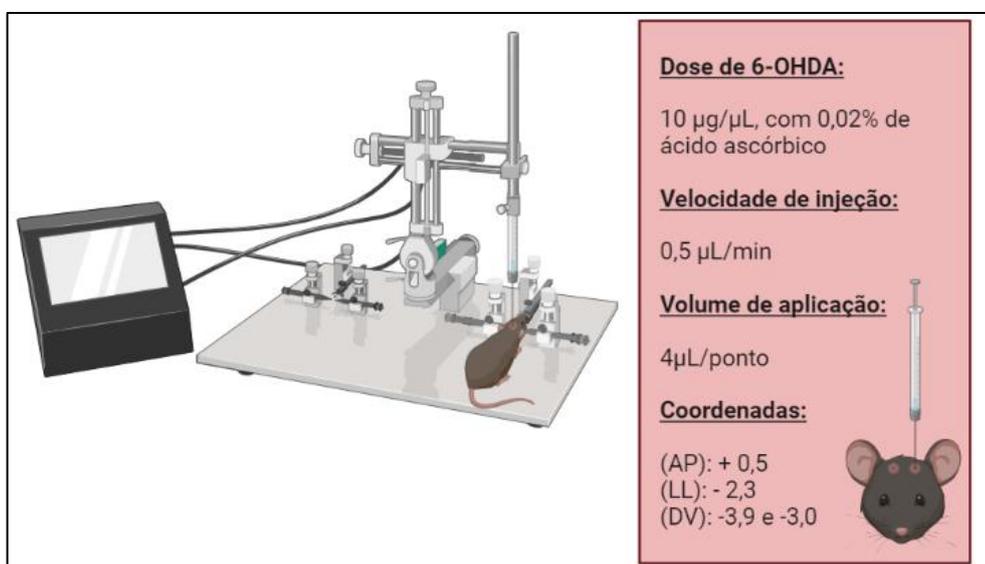


Figura 13: Imagem ilustrativa de um aparelho de cirurgia estereotáxica com as especificações da cirurgia.

Imagem criada pelo BioRender.

Após a cirurgia os animais são mantidos em uma sala aquecida por uma semana, com amoxicilina triidratada (5 mg/mL) fornecida no bebedouro dos animais para que eles se recuperem dessa cirurgia invasiva. Os animais não são manipulados durante este período para garantir sua recuperação, mas mesmo com esses cuidados, 25% dos animais chegam a óbito.

4.4 ANÁLISE DA EXTENSÃO DA LESÃO COM 6-OHDA: CONTAGEM DE GIROS INDUZIDOS POR APOMORFINA

Após 19 dias da indução da lesão unilateral com 6-OHDA, os animais foram submetidos à análise de giros induzidos por Apomorfina. Este experimento foi utilizado para medir o grau de perda dos neurônios dopaminérgicos da substância negra e, com isso, separar os grupos experimentais com uma “lesão homogênea” entre eles. Para isso, a apomorfina foi administrada subcutaneamente (dose de 0,5 mg/Kg) e os animais foram alocados em cilindros de vidro (de 15 cm de diâmetro) e analisados durante 45 minutos. O teste de rotação por apomorfina se baseia nos estudos de Iancu e colaboradores (2005) e Ungerstedt de 1971, no qual foi observado que a lesão com 6-OHDA possui correlação com a quantidade giros induzidos por Apomorfina em ratos lesionados unilateralmente com 6-OHDA no estriado. Os resultados do estudo de Ungerstedt demonstraram que uma lesão de 90% no estriado é necessária para que o animal apresente comportamentos giratórios no sentido contralateral a lesão. A apomorfina atua como agonista de receptores dopaminérgico D1 e D2, e sua administração em animais parkinsonianos provoca a ativação exacerbada dos receptores dopaminérgicos remanescentes que se encontram sensibilizados devido a denervação dopaminérgica causada pela lesão da via nigroestriatal (**Figura 14**). Dessa forma, a apomorfina estimula a cascata de ativação dos receptores dopaminérgicos de forma exacerbada, promovendo hiperativação dos receptores do lado ipsilateral à lesão. Como as vias motoras descendentes decussam no tronco encefálico, a hiperestimulação dos receptores dopaminérgicos estimula periféricamente o lado contralateral a lesão, e, dessa forma, o animal apresenta o comportamento giratório no sentido contralateral à lesão com 6-OHDA. Conforme o estudo de Iancu et. al. (2005), os animais que apresentaram ao menos 2 rotações por minuto, pode ser interpretado possuir pelo menos 70% de lesão nigroestriatal (IANCU *et al.*, 2005), sendo que a lesão é suficiente para induzir a LID frente administração crônica com L-DOPA. Os animais que apresentam um mínimo de 90 giros durante os 45 minutos de teste são considerados ter uma lesão mínima satisfatória para receberem o tratamento com L-DOPA, sendo considerados como grupo de “alta lesão”, enquanto que os animais que apresentam menos de 90 giros contralaterais são considerados o grupo de “baixa lesão”. Esses animais de “baixa lesão” foram realocados em um grupo extra de

experimentação, visto que com uma baixa lesão não seria possível induzir movimentos de discinesia por meio do tratamento crônico com L-DOPA.

Em seguida, os animais foram acondicionados conforme seus respectivos grupos para receberem os devidos tratamentos com as drogas e então passarem pelos demais experimentos.

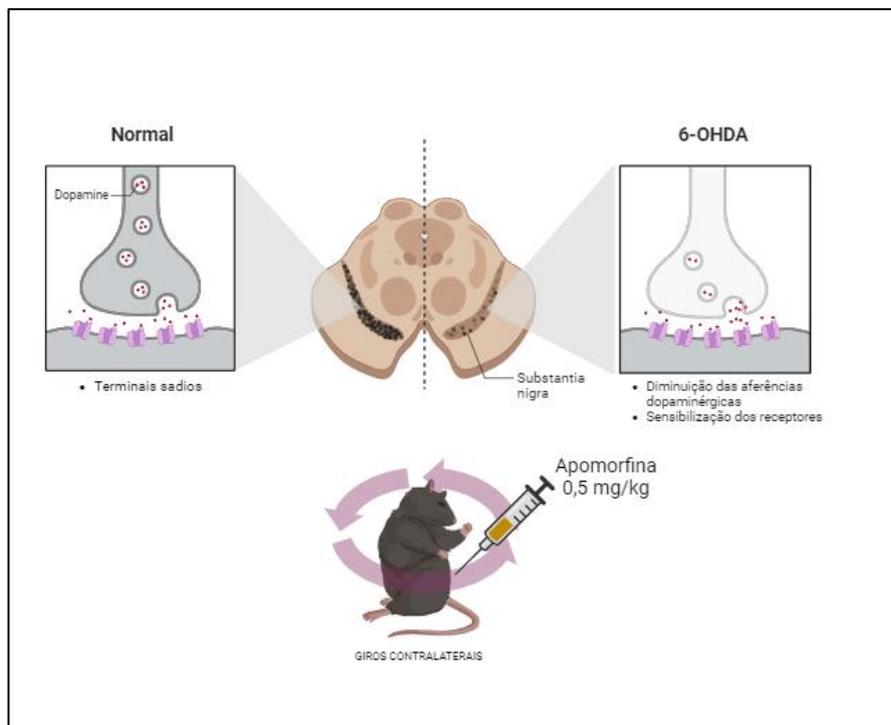


Figura 14: Imagem ilustrativa do conceito fisiológico do teste de giros induzidos por Apomorfina. Neste teste o agonista dopaminérgico estimula os receptores sensibilizados, resultando no comportamento rotacional dos animais. Quanto maior a estimulação causada pela droga, maior o número de giros induzidos no animal, ou seja, maior o grau da lesão na substância negra. Na parte superior há uma representação da aferência dopaminérgica que chega ao estriado. Do lado esquerdo, a situação fisiológica normal, e do lado direito, uma representação lúdica da perda das aferências dopaminérgicas. Ao centro temos a Substância Negra desmielinizada, conforme há perda dos neurônios dopaminérgicos. Na parte inferior da figura temos à esquerda o camundongo sadio, que não possui hiperestimulação dopaminérgica conforme administração do agonista, e do lado direito, o camundongo que apresenta a hiperlocomoção contralateral conforme administração do agonista dopaminérgico, que estimulará os receptores sensibilizados no estriado do lado lesionado do cérebro do animal. Figura de autoria da autora, produzida no BioRender.

4.5 DETERMINAÇÃO DA DOSE DE LPS: TESTE DA TEMPERATURA

Com o intuito de avaliar se o LPS é capaz de exacerbar a LID através da indução de uma inflamação sistêmica, utilizamos como base teórica o trabalho de Mulas et. al. (2016). As doses de LPS utilizadas foram de 0,05, 0,1, 0,2, 0,5 e 2,0 mg/Kg (i.p.). O grupo controle recebeu apenas o veículo (salina 0,9%, i.p.).

Primeiramente, aferimos a temperatura corporal basal previamente à administração do LPS (Câmera Termográfica Flir Tg267 19.200 Pixels Msx Tipo C5). Em seguida, foi administrado o LPS. Após uma hora aferiu-se novamente a temperatura corporal do animal

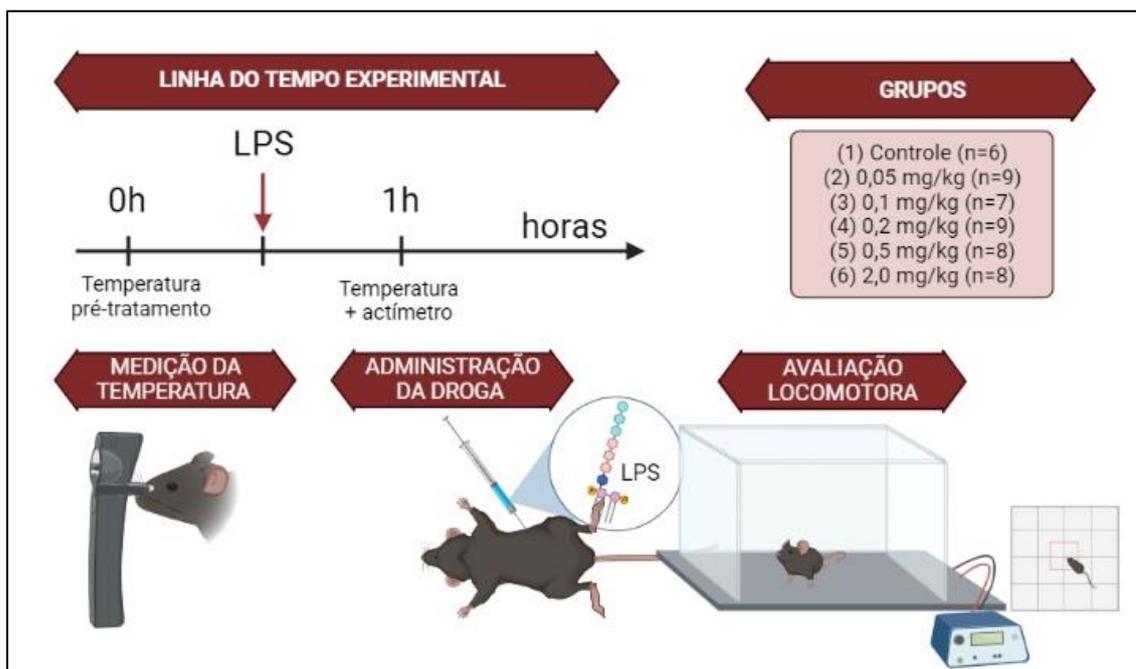


Figura 15: Desenho experimental da curva dose-resposta de LPS. Este experimento visa obter a manifestação da inflamação sistêmica sem o comprometimento da locomoção dos camundongos. Na parte superior da figura, à esquerda, temos a linha temporal do experimento, onde, primeiramente foi medida a temperatura do animal e em seguida administrado o LPS. Uma hora após a inoculação do LPS aferiu-se novamente a temperatura do corpo do animal e a sua locomoção. A direita, na parte superior, temos os grupos utilizados com suas respectivas doses e o número amostral de camundongos utilizados. Na parte inferior da figura tem-se representações dos métodos utilizados na análise. Na esquerda, temos o equipamento utilizado para medição da temperatura corporal, que o faz por meio de uma fotografia termográfica focalizada no olho do animal. Ao meio, temos a administração do LPS, com a estrutura química da molécula. A direita, temos uma representação do equipamento utilizado para realização do teste de actímetro, o qual possui uma placa tátil e lasers nas laterais que são capazes de medir a locomoção horizontal, vertical e movimentos estereotipados do animal.

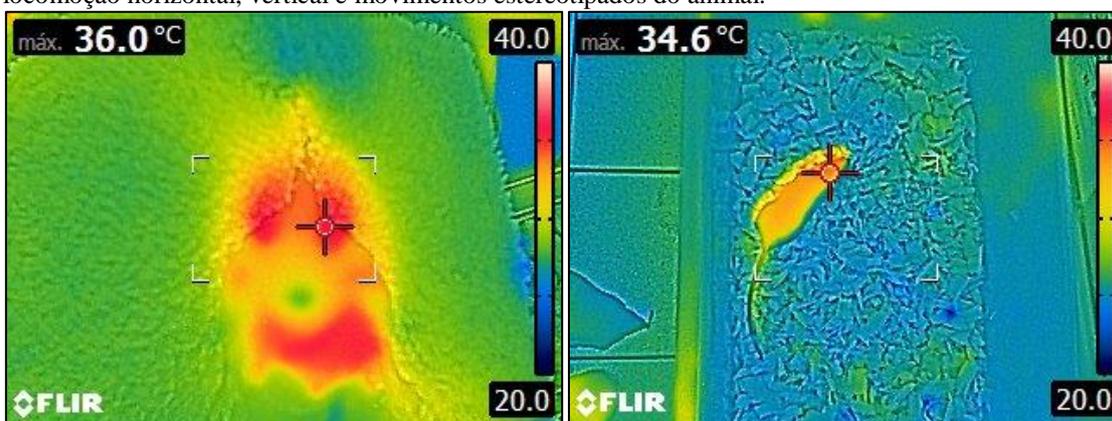


Figura 16: Fotos termográficas de camundongos: à esquerda está o camundongo com o vetor de maior intensidade de temperatura focado em seu olho esquerdo. Esse vetor registra a temperatura no canto esquerdo superior da imagem e é representativo da temperatura corporal do animal. À direita temos uma foto termográfica do camundongo de corpo inteiro em sua caixa, com o vetor de temperatura localizado em sua cabeça. No experimento foi utilizado as medições feitas no olho do animal, devido sua maior acurácia. Imagens feitas pela autora.

4.6 DESENHO EXPERIMENTAL

A partir dos resultados do experimento comportamental de giros induzidos por Apomorfina, foram elaborados 2 conjuntos de grupos experimentais. O primeiro grupo foi constituído dos seguintes subgrupos:

- (a) Sham/salina (n=7)
- (b) 6-OHDA/salina (n=7)
- (c) 6-OHDA/LPS/salina (n=9)
- (d) 6-OHDA/salina/L-DOPA (n=8)
- (e) 6-OHDA/LPS/L-DOPA (n=9)
- (f) 6-OHDA/LPS/L-DOPA (“baixa lesão”) (n=7)

Já o segundo grupo experimental foi dividido nos seguintes subgrupos:

- (a) Sham/salina (n=7)
- (b) Sham/salina/L-DOPA (n=5)
- (c) Sham/LPS/salina (n=5)
- (d) Sham/LPS/L-DOPA (n=6)
- (e) 6-OHDA/salina (n=7)
- (f) 6-OHDA/salina/L-DOPA (n=8)
- (g) 6-OHDA/LPS/salina (n=8)
- (h) 6-OHDA/LPS/L-DOPA (n=8)
- (i) 6-OHDA/LPS/L-DOPA (“baixa lesão”) (n=6)

Os animais passaram por etapas de tratamento crônico com drogas (LPS e L-DOPA), análises comportamentais e análises moleculares. No dia zero, os camundongos receberam uma dose única de LPS (0,1 mg/kg, i.p.). Uma hora depois, os animais tiveram a sua temperatura corporal aferida, controlando a instauração da inflamação sistêmica. No dia seguinte, foi iniciada a administração crônica da L-DOPA (25 mg/kg, com 10 mg/kg de benserazida), que foi realizada uma vez ao dia (no período da manhã), durante 15 dias. Em seguida, foram realizadas as análises comportamentais de *scores* de discinesia (dias 1, 5, 10, 15) e análises locomotoras utilizando o teste de actímetro (dias 2, 6, 11 e 16). Por fim, no décimo sétimo dia, os animais foram sacrificados, para realizarmos análises moleculares do conteúdo proteico dos núcleos afetados pela lesão com 6-OHDA e pelo tratamento com a L-DOPA. O estriado dorso-lateral lesionado foi usado para *western blot*, e a substância negra foi utilizada para imunohistoquímica. O desenho experimental pode ser observado na **Figura 17**.

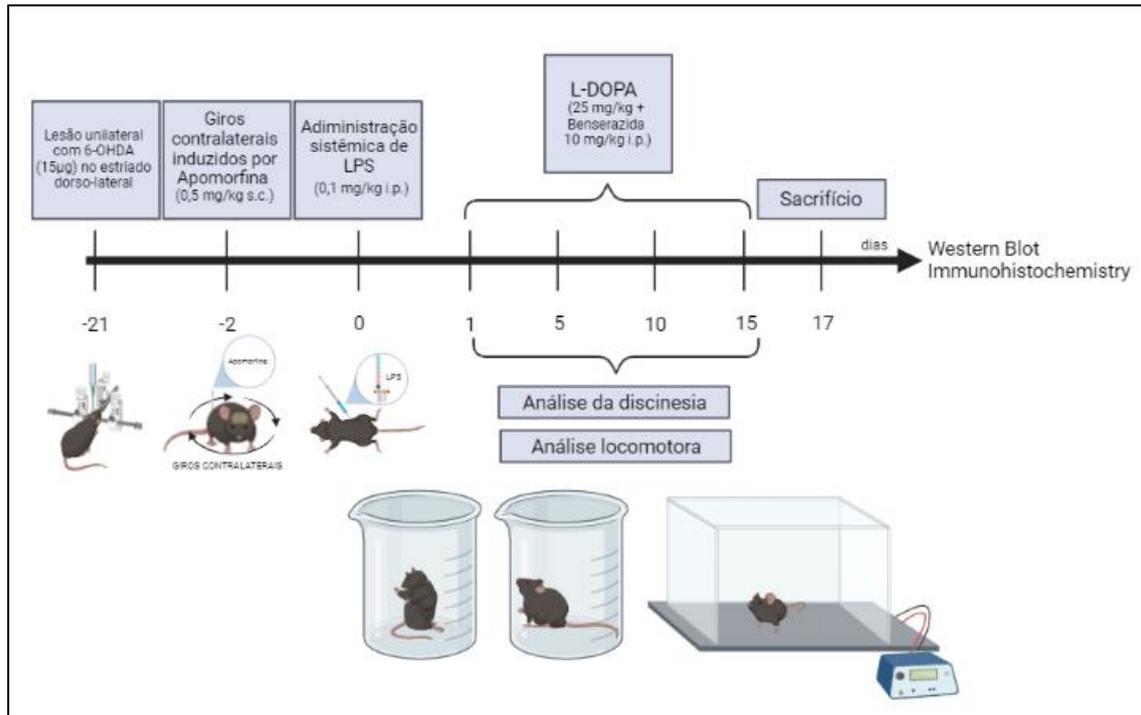


Figura 17: Desenho experimental e linha do tempo. Os camundongos foram lesionados com 6-OHDA e permaneceram em repouso por 3 semanas para o estabelecimento da lesão. Posteriormente, avaliou-se a intensidade da lesão através do teste de rotação induzida por apomorfina. Após isso, os animais com lesão confirmada foram separados em seus respectivos grupos. O tratamento com LPS ocorreu no dia 0 e, já no dia seguinte, iniciou-se o tratamento com L-DOPA o qual foi mantido todos os dias até o dia do sacrifício. Nos dias 1, 5, 10 e 15 os animais tiveram a discinesia avaliada pelo teste comportamental de escores de discinesia, além do teste do actímetro realizado nos dias 2, 6, 11 e 16. No 17º dia os animais foram sacrificados, de forma que o estriado dorsolateral lesionado foi separado para análises por *western blot* e a substância negra para imunohistoquímica.

4.7 INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DA DISCINESIA

Após a administração de 0,1mg/Kg de LPS (i.p) no dia zero, os animais passaram por uma avaliação da intensidade da inflamação sistêmica, analisada pela variação da temperatura corporal. Esse experimento teve como base o trabalho de Mulas et. al., 2016. A análise locomotora foi feita em todos os grupos (que receberam LPS ou não) antes da administração do LPS e 1 hora após. Da mesma maneira, a temperatura corporal também foi avaliada antes da administração e 1 hora após. Feito isso, os animais estavam aptos para iniciarem o tratamento crônico com L-DOPA, a partir do dia seguinte.

4.8 ANÁLISE DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA (LID)

Os grupos experimentais, inoculados ou não com LPS, receberam por 15 dias, L-DOPA (25 mg/Kg, com 10 mg/Kg de benserazida em salina 0,9%, i.p.). A administração ocorreu durante os 15 dias de tratamento, entre 8h30 e 10h, e análise de discinesia foi realizada nos dias

1, 5, 10 e 15 após a administração do LPS feita um dia antes ao início do tratamento crônico com L-DOPA. Após receberem L-DOPA os animais foram alocados em cilindros de vidro (com 15 cm de diâmetro) e tiveram seus movimentos avaliados conforme intensidade e prevalência. Os movimentos avaliados foram: orofaciais, axiais (de torção do tronco do animal) e límbicos (de movimentação da pata do animal). Cada animal foi avaliado por 2 minutos a cada intervalo de 30 minutos após a administração de L-DOPA (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min). Após 180 minutos os animais foram avaliados pela última vez e então foi encerrada a avaliação. Os movimentos avaliados recebem escores de 0-4 conforme a intensidade de manifestação e prevalência durante o tempo de avaliação.

Os movimentos avaliados receberam escores conforme especificado a seguir:

(1) Incidência – tempo de discinesia

0: ausente

1: menos de 50% do tempo

2: mais de 50% do tempo

3: o tempo todo, mas para com estímulo sonoro ou tátil

4: o tempo todo e não para com estímulo sonoro ou tátil

(2) Discinesia axial – torção do tronco

0: ausente

1: torção de 30°

2: torção de 60°

3: torção de 90°

4: torção intensa com perda de equilíbrio, rotação completa, podendo fazer o animal deitar

(3) Discinesia do membro anterior – “límbica”

0: sem movimento

1: movimento dos dígitos das patas

2: movimentos dos dígitos e do braço

3: movimento do braço todo, podendo ter rotação do membro

4: movimento do braço todo, fazendo o animal esticar o membro todo

(4) Discinesia orofacial

0: sem movimentos

1: movimento de tremor da mandíbula ou mastigação, sem abertura da boca

2: movimentos de tremor e mastigação, com ocasional abertura involuntária da boca

3: movimento de tremor e mastigação frequentes e intensos, com abertura da boca e ocasional protrusão da língua

4: todos os movimentos anteriores, fazendo o animal se morder para tentar diminuir a incidência da discinesia.

Os escores de cada animal foram avaliados de forma individual e posteriormente somados formando um escore do grupo experimental, tendo como base os trabalhos de (ANGELA CENCI; LUNDBLAD, 2007; PAVÓN *et al.*, 2006)

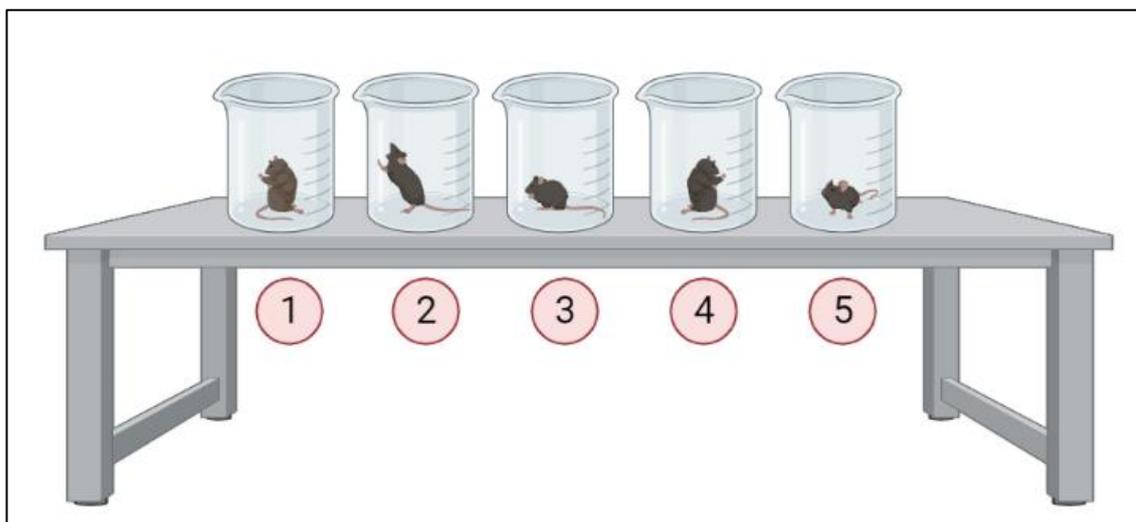


Figura 18: Representação ilustrativa da análise da discinesia. Nessa representação, os animais 1 e 4 estão apresentando uma discinesia axial, camundongo 2 está apresentando uma discinesia orofacial e os animais 3 e 5 não estão apresentando discinesia neste momento. Imagem criada no BioRender.

4.9 ANÁLISE LOCOMOTORA – TESTE NO ACTÍMETRO

Os camundongos tiveram a locomoção avaliada em dois momentos: uma na curva dose-resposta de LPS, e outra na avaliação locomotora do tratamento com L-DOPA. A locomoção é avaliada através do teste de actímetro (modelo LE8810, Panlab, Barcelona Espanha) por um período de 5 minutos. A arena deste aparelho possui lasers infravermelhos (1 a cada intervalo de 2,5cm) os quais são capazes de detectar os movimentos horizontais, verticais e estereotipados.

Na curva dose-resposta do LPS, os animais foram avaliados antes de receber o LPS, e uma hora após a administração do LPS, cada grupo com suas respectivas doses (ver tópico 4.5).

A avaliação da locomoção durante o tratamento com L-DOPA por meio de teste de actímetro foi efetuada nos dias 0 (antes da administração do LPS), 2, 6, 11 e 16 após o início do tratamento com a L-DOPA. A avaliação ocorreu após 30 minutos da administração da droga, haja visto que o seu pico plasmático ocorre neste período (TOLOSA *et al.*, 1975).

4.10 PREPARAÇÃO DO TECIDO PARA ANÁLISES POST-MORTEM

Após todas as etapas de análises comportamentais, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e tiveram seus encéfalos dissecados com o auxílio de uma matriz (Matriz EFF51, Insight, coordenada -2 a partir do bregma). O estriado lesionado foi então separado para análises de *western blot*, e a substância negra, para imunohistoquímica. O sacrifício foi realizado com auxílio da Técnica do laboratório Célia Aparecida da Silva e todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Manipulação de Animais de Experimentação.

4.11 ANÁLISE DO CONTEÚDO DE PROTEÍNAS DO ESTRIADO DORSOLATERAL: WESTERN BLOT - SDS-PAGE (WB)

O estriado lesionado (lado direito) dos camundongos foi extraído e homogeneizado em 100 µL de tampão MPER contendo inibidores de protease e fosfatase (1%). O homogenato foi centrifugado à 10.000 rpm por 10 minutos à 4°C, formando assim um corpo de fundo constituído pelos *debries* celulares das células lisadas. Em seguida, o conteúdo proteico foi separado em tubos individuais e então foram quantificados pelo método de absorbância utilizando o reagente de *Bradford* (com leituras feitas à 595nm, BioTek - EPOCH microplate reader 2). Com a concentração individual de cada amostra, ajustamos o conteúdo de proteínas a uma diluição comum de 1,5 µg/µL, sendo que desse conteúdo proteico nós quantificamos TLR4 e MyD88.

Por seguinte, a etapa de eletroforese do WB foi realizada em gel de bis-acrilamida (10%), sob corrente de 400mA, 120 V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos (Fonte de eletroforese de alta corrente – Loccus LPS 300HC). As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, sob corrente de 400mA, 25V, por 1 hora (Transblot SD Semi-dry Transfer cell). Em seguida, as membranas foram submersas em solução de leite desnatado (5% em TBS) por 1 hora, lavadas três vezes com TBS 10mL por membrana por 10 minutos e então incubados com o anticorpo primário (anti-TLR4 ou anti-MyD88 1:1000) diluído em TBS-T, *overnight* à 4°C utilizando Shaker Gyromax™, modelo 737R, Armex Instruments; [TLR4: (M-300); sc-30002; lot #E2913; rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology]; [Myd-88: (D8OF5); rabbit mAb; lot #4283S; Cell Signaling].

No dia seguinte, o anticorpo primário foi recuperado e lavou-se a membrana 3 vezes com TBS-T (durante 10 minutos, em temperatura ambiente). Logo após, as membranas foram incubadas por 2 horas com anticorpo primário anti-GADPH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GADPHGAPDH: (FL-335); sc-25778; lot #D1613; rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology) para o TLR4 e anti- α -tubulina (α -tubulin: (E-19)-R; sc-12462-R;

Lot #J0109; rabbit polyclonal IgG; Santa Cruz Biotechnology) para o MyD88 (ambas na diluição de 1:2000).

Posteriormente, os anticorpos foram recuperados e as membranas lavadas com TBS-T. Logo depois, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com a enzima peroxidase por 2 horas à temperatura ambiente, na diluição de 1:5000; [Anti-rabbit IgG; HRP-linked antibody; Cell Signaling; #7074S]. Por fim, recuperou-se o anticorpo secundário e lavou-se novamente as membranas com TBS-T. A revelação foi realizada utilizando kit ECL em equipamento que detecta quimioluminescência (Gel Doc TM XR + System). As imagens capturadas pelo equipamento foram analisadas através da mensuração da densidade óptica das bandas de cada amostra utilizando o *software* Image J (National Health Institute, USA).

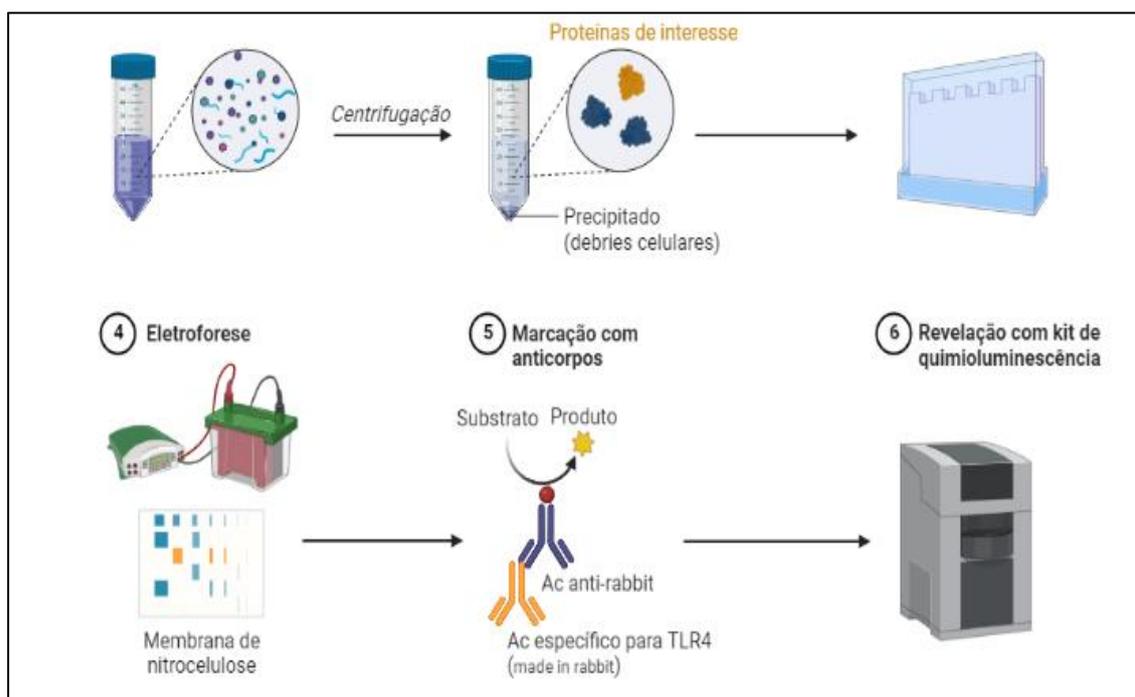


Figura 19: Modelo representativo do protocolo experimental da técnica de Western blot. O primeiro passo representa o estriado dorsolateral homogeneizado em tampão MPER com 1% de inibidores de proteases e fosfatases. Em seguida o conteúdo é centrifugado até a formação do pellet de debris celulares. O sobrenadante é recolhido, quantificado e diluído em Laemli contendo β -mercaptoetanol para a etapa de eletroforese em gel de bis-acrilamida. Após a corrida eletroforética, as proteínas separadas, são transferidas para uma membrana de nitrocelulose (não indicada na figura), para então, poderem ser marcadas com anticorpos específicos para as proteínas (GAPDH, α -tubulina, TLR4 ou MyD88). Após a marcação com anticorpos conjugados com peroxidase, é fornecido substrato quimioluminescente para revelação no equipamento detector, para verificar a intensidade das bandas. Imagem criada no BioRender.

4.12 ANÁLISE DA INTENSIDADE DA LESÃO COM 6-OHDA: IMUNOHISTOQUÍMICA

Após o sacrifício dos camundongos, os animais tiveram seu mesencéfalo extraído e fixados em solução de Somogyi & Takagi (0,1 M tampão fosfato monossódico – pH 7,4, 15% ácido pícrico, 4% paraformaldeído e 0,05% glutaraldeído) por 48 horas. Em seguida, os

encéfalos foram transferidos para solução de sacarose 30% por 24 horas ou até a sua decantação completa. Após a crioproteção com solução de sacarose, o tecido foi congelado em isopentano e gelo seco à -40°C. Os encéfalos foram armazenados em freezer à -80°C até a realização dos cortes em criostato. As secções foram cortadas com espessura de 30µm utilizando criostato (Leica® modelo CM1850) e posteriormente armazenadas em solução anticongelante contendo 30% de sacarose e etilenoglicol (diluído em tampão fosfato de sódio 0,2M). Por fim, realizou-se a imunohistoquímica para a marcação de Tirosina Hidroxilase (TH), enzima passo-limitante da síntese de catecolaminas.

As secções foram lavadas 3 vezes em tampão A (tampão fosfato mono e dibásico [0,1M] em cloreto de sódio, acrescido de triton X-100) e, em seguida, realizou-se a recuperação antigênica com tampão citrato (pH 6,0) à 70°C em banho maria, sob agitação leve e constante por 30 minutos. Novamente o tecido foi lavado em tampão A e realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena. Dessa forma, realizamos esta etapa para saturação desta enzima utilizando peróxido de hidrogênio 30% em concentração de 0,03% também diluído em tampão A por 30 minutos. Em seguida, o tecido foi lavado e incubado por 1 hora com soro fetal bovino (BSA, 2%) + soro específico para o anticorpo secundário (soro goat 5%, Vector Labs), de forma a bloquear as reações inespecíficas com proteínas do tecido. Por fim, o tecido foi incubado com o anticorpo primário anti-TH (rabbit anti-TH, Pel Freez, 1:2000), overnight à 4°C utilizando Shaker Gyromax™.

No dia seguinte, o anticorpo foi recuperado e o tecido lavado com Tampão A. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado (goat anti-rabbit, Vector Labs, 1:400), por uma hora e meia a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo secundário o tecido foi lavado com Tampão A e em seguida incubado com solução contendo o complexo avidina-biotina (AB), por 2 horas. Por fim, realizou-se a reação de revelação utilizando o cromógeno diaminobenzedina (DAB) (10mg para cada 20mL diluído em TBS 0,25M, tamponado com HCl 23%, pH, 7,4). Esta reação depende da geração de oxigênio livre (O₂) o qual é produzido pela enzima peroxidase presente no complexo AB. O oxigênio oxida a molécula de DAB, a qual forma um precipitado de cor acastanhada indicando reação positiva para a ligação do antígeno do tecido com a cascata de amplificação de sinal inicia pelo anticorpo primário.

As secções de cérebro foram montadas em lâminas gelatinizadas e posteriormente diafanizadas e incluídas em meio de montagem permanente (Entellan) junto com a lamínula. As lâminas foram observadas em microscópio de luz (Leica DM6 B). Fotomicrografias representativas da SNc foram tiradas em objetiva de 20X e posteriormente analisadas utilizando

o software Image J através da contagem do número de corpos celulares remanescentes positivos para TH.

A intensidade de lesão resulta da comparação entre o número de corpos celulares imunorreativos para TH na substância negra compacta do grupo não lesionado (Sham) e dos grupos lesionados. Foi avaliado a densidade óptica das terminações dopaminérgicas.

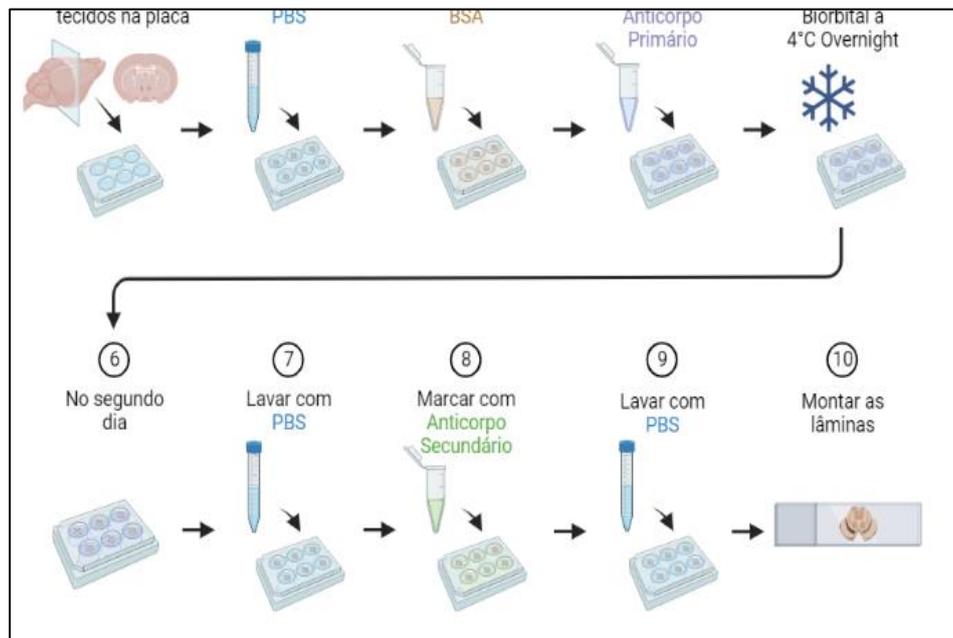


Figura 20: Passo-a-passo ilustrativo do método de imunohistoquímica para a marcação da Tirosina Hidroxilase em fatias do cérebro de camundongos hemiparkinsonianos. Os passos do método são descritos em mais detalhes no corpo do texto. Imagem feita pelo BioRender.

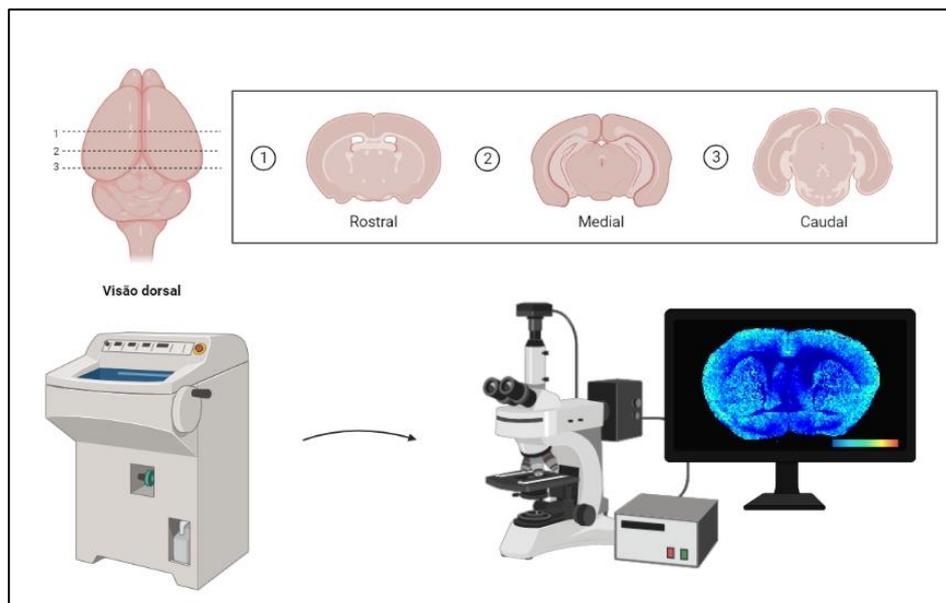


Figura 21: Demonstração do processo de Imunohistoquímica. Nesta representação ilustrativa temos fatias de substância negra (rostral, medial e caudal) que foram fatiadas e marcadas com DAB (figura anterior) e reveladas em microscópio de luz para verificar a intensidade de marcação da TH. Imagem feita pelo BioRender.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas pelo software Prisma (GraphPad Prism 8.0.1). As medidas de temperatura e da discinesia foram analisadas por ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni, com $p < 0,05$; e as demais análises (actímetro, apomorfina, *western blot* e imunohistoquímica) foram analisadas por ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni, com $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 CURVA DOSE-RESPOSTA LPS: INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA

As doses de 0,05; 0,1 e 0,2mg/Kg de LPS induziram inflamação sistêmica: Nosso primeiro objetivo foi encontrar qual dose de LPS seria capaz de induzir uma inflamação sistêmica sem afetar o comportamento motor do animal. Para verificar se a inflamação sistêmica foi instalada e se houve alteração na atividade locomotora, utilizamos o teste de temperatura corporal e actímetro, em um grupo de animais controle. Os grupos que receberam as doses de 0,05; 0,1 e 0,2 mg/kg de LPS (**Figura 22**) apresentaram queda significativa da temperatura ($F(2,68) = 17,33$, $p < 0,0001$) sendo este um indício de instalação da inflamação sistêmica ($p < 0,05$ em relação a temperatura inicial) (HABICH, 1987). As doses de 2,0 e 0,5 mg/Kg de LPS não alteraram a temperatura corporal ($p = 0,9465$ e $p = 0,8529$, respectivamente).

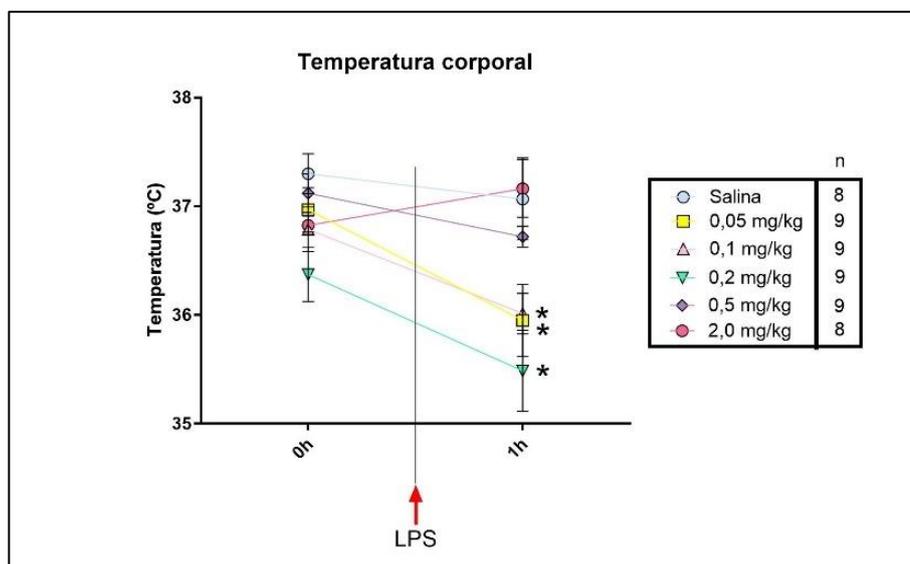


Figura 22: Curva dose-resposta do LPS – Temperatura corporal. O tempo 0 corresponde a temperatura basal dos animais antes de receberem o LPS. Após 1h da injeção do LPS aferimos novamente a temperatura. Os grupos que receberam 0,05; 0,1 e 0,2 mg/kg de LPS apresentaram queda da temperatura corporal em relação a sua temperatura basal (n=8-9). ANOVA de duas vias, seguido de Bonferroni, com $p < 0,05$.

Em relação à locomoção, os grupos que receberam a dose de 0,2; 0,5 e 2,0 mg/kg apresentaram diminuição dos movimentos horizontais ($F(5,46) = 13,51$, $p < 0,0001$). As doses de 0,05 e 0,1mg/Kg não promoveram redução dos movimentos horizontais ($p > 0,9999$ e $p = 0,2130$, respectivamente). Em relação aos movimentos verticais, somente a dose mais alta

de 2,0 mg/kg de LPS induziu queda significativa em relação ao controle ($p < 0,05$ em relação ao grupo salina). As demais doses de LPS (0,05; 0,1; 0,2 e 0,5 mg/Kg) não induziram redução dos movimentos verticais (todas com $p > 0,9999$). A partir desses resultados, optamos por prosseguir nossos experimentos com a dose de 0,1 mg/kg de LPS, haja visto que essa dose promoveu inflamação sistêmica e não induziu prejuízo locomotor.

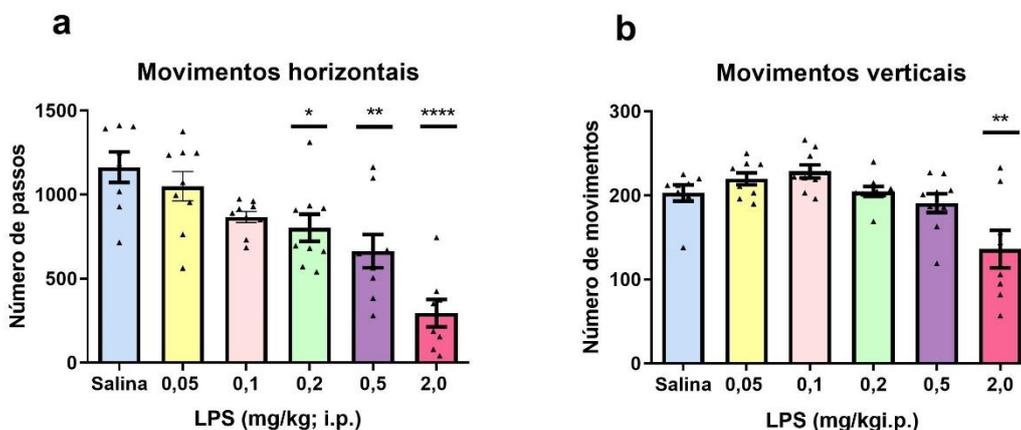


Figura 23: Curva dose-resposta do LPS - Análise Locomotora. (a) Análise dos movimentos horizontais medidos 1 hora após a administração do LPS i.p.; (b) Análise dos movimentos verticais medidos 1 hora após a administração de LPS sistêmico. Em (a), os grupos 0,2; 0,5 e 2,0 mg/kg de LPS i.p. apresentaram queda dos movimentos horizontais em relação ao grupo salina, e em (b) apenas o grupo 2,0 mg/kg de LPS i.p. apresentou queda dos movimentos verticais em relação ao grupo salina (n igual a figura anterior). Significância estatística de * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ ou **** $p < 0,0001$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni.

Posteriormente à escolha da dose, o mesmo protocolo de instalação da inflamação e avaliação experimental foi utilizado para garantir e validar a metodologia, como um controle prévio, para o desenvolvimento dos experimentos seguintes (**Figura Suplementar 1 e 2**).

5.2 CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL DA LESÃO ESTRIATAL COM 6-OHDA

Os animais com lesão da via nigroestriatal apresentaram comportamento rotatório no teste da apomorfina: A fim verificar o estabelecimento, ou não, da lesão da via nigroestriatal, bem como para alocar homogeneamente os animais lesionados em seus respectivos grupos

experimentais, realizamos o teste de rotação induzida por apomorfina ($F(5,30)=22,26$, $p>0,0001$). Neste experimento (**Figura 23**), os animais lesionados (grupos 2, 3, 4 e 5) foram separados de forma a ficarem em grupos distintos com média homogênea de giros, não havendo diferença entre si (2 vs. 3, $p>0,9999$; 2 vs. 4, $p>0,9999$; 2 vs. 5, $p>0,9999$; 3 vs. 4, $p>0,9999$; 3 vs. 5, $p>0,9999$; 4 vs. 5, $p>0,9999$). Houve diferença significativa em relação ao grupo não lesionado com 6-OHDA ou grupo Sham (Grupo 1) (1 vs. 2; 1 vs. 3; 1 vs. 4; 1 vs. 5, $p<0,0001$). O sexto grupo foi composto por animais que apresentaram número totais de giros menor ou igual a 90, compondo o grupo de baixa lesão. O grupo 6 não apresentou diferença em relação ao grupo 1 (Sham, $p>0,9999$), mas apresentou diferença significativa em relação aos grupos 2, 3, 4 e 5 (valores de p; 6 vs. 2, $p=0,0003$; 6 vs. 3, $p=0,0001$; 6 vs. 4, $p<0,0001$; 6 vs. 5, $p=0,0001$).

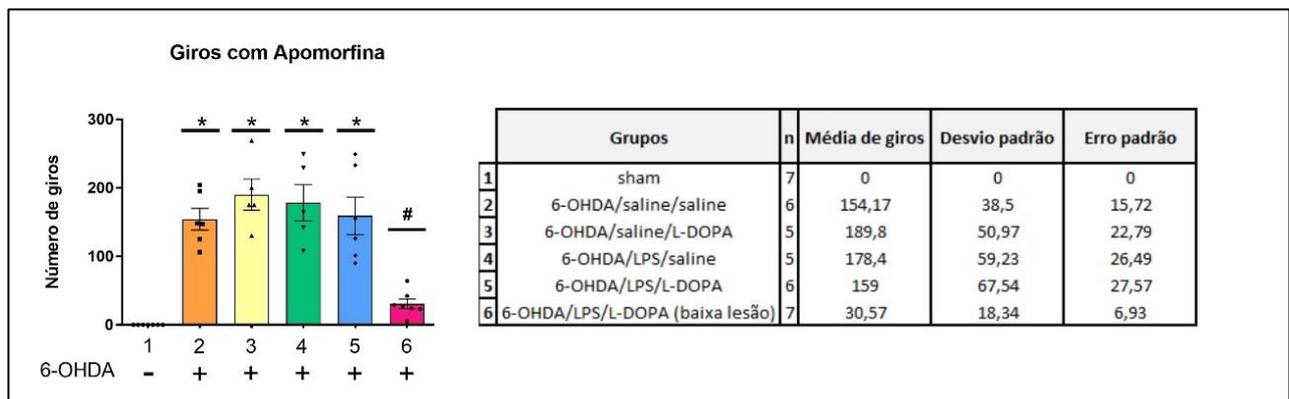


Figura 24: Giros induzidos por Apomorfina (Grupo 1). Os grupos 2, 3, 4 e 5 apresentaram giros contralaterais quando comparados com o grupo *sham* (1). Além disso, as médias entre os grupos lesionados com 6-OHDA 2, 3, 4 e 5 se apresentaram homogêneas entre si. O grupo 6 não apresentou diferença significativa em relação ao grupo 1, mas apresentou diferença significativa em relação aos grupos 2, 3, 4 e 5. Significância estatística de * $p<0,05$ quando comparado com o grupo controle e # $p<0,05$ quando comparado com grupos 2, 3, 4 e 5. ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni.

O segundo grupo de animais foi composto por 9 subgrupos, igualmente lesionados com a 6-OHDA. Esses animais foram submetidos ao teste de giros induzidos por apomorfina e também foram separados em grupos, de forma homogênea (**Figura 25**, $F(5,52)=30,86$, $p<0,0001$). Os grupos 1, 2, 3 e 4 não foram lesionados com 6-OHDA (Sham), e não apresentaram comportamento rotatório. Os demais grupos foram lesionados (5, 6, 7, 8 e 9). Os grupos 5, 6, 7 e 8 apresentaram média de giros homogênea sem diferença entre si (valor de p de cada um, 5 vs. 6, $p>0,9999$; 5 vs. 7, $p>0,9999$; 5 vs. 8, $p>0,9999$; 6 vs. 7, $p>0,9999$; 6 vs. 8, $p>0,9999$; 7 vs. 8, $p=0,9497$), mas com diferença em relação aos grupos não lesionados (1, 2, 3 e 4 vs. 5, $p<0,0001$; 1, 2, 3 e 4 vs. 6, $p<0,0001$; 1, 2, 3 e 4 vs. 7, $p<0,0001$; 1, 2, 3 e 4 vs. 8,

$p < 0,0001$). O grupo 9 apresentou média de giros menor ou igual a 90, logo estes animais foram agrupados no grupo baixa lesão. Não houve diferença entre o grupo baixa lesão e os grupos não lesionados (1, 2, 3 e 4 vs. 9, $p > 0,9999$), todavia houve diferença em relação aos grupos 5, 6, 7 e 8 (5 vs. 9, $p = 0,0004$; 6 vs. 9, $p < 0,0001$; 7 vs. 9, $p = 0,0092$; 8 vs. 9, $p < 0,0001$). Após a divisão dos grupos experimentais, os subgrupos receberam os tratamentos com as drogas especificadas na tabela ao lado do gráfico (**Figuras 24 e 25**, lado direito), e passaram pelos seguintes experimentos comportamentais.

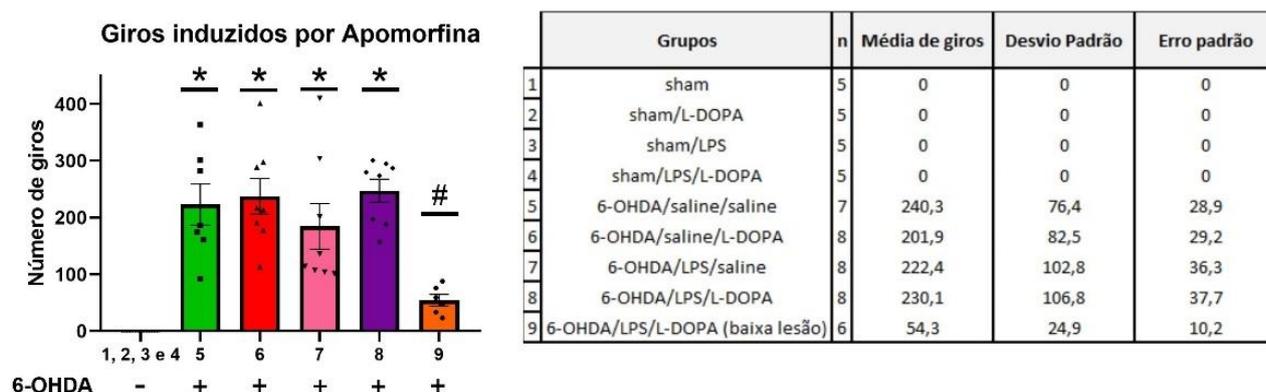


Figura 25: Giros induzidos por Apomorfina (Grupo 2). Os grupos Sham (1, 2, 3 e 4 agrupados) não apresentaram giros contralaterais induzidos por apomorfina. Os grupos 5, 6, 7 e 8 apresentaram comportamento rotatório, apresentando médias homogêneas entre si. O Grupo 9 foi composto por animais que apresentaram baixo número de giros. O grupo 9 não apresenta diferença em relação aos grupos não lesionados, entretanto há diferença em relação aos grupos 5, 6, 7 e 8 ($\#p < 0,01$). Significância estatística de $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle. ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni.

5.3 EXACERBAÇÃO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA VIA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA POR LPS

O LPS aumentou os escores de discinesia induzida por L-DOPA: Tendo estabelecido a inflamação sistêmica por meio da administração de LPS (0,1mg/Kg), avaliamos se este insulto prévio ao tratamento com L-DOPA promoveria exacerbação da discinesia. Na **Figura 26-A** estão demonstrados os escores somados de cada movimento discinético (axial, orofacial e do membro superior) contabilizando o escore do grupo. Os animais tratados com LPS (0,1mg/Kg) + L-DOPA (grupo linha azul, [5]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA, **Figura 26-A**) apresentaram escores de discinesia maiores que o grupo que não recebeu LPS (grupo linha amarela, [4]: 6-OHDA/salina/L-DOPA, **Figura 5 A**) nos dias 5, 10 e 15 quando comparados com o grupo [4] ($F(2,15) = 24,48$, $p < 0,0001$).

Em relação aos escores individuais de discinesia (**Figura 26 B, C e D**), houve diferença do grupo [5]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA em relação ao grupo controle [4] nos escores de discinesia axial (**Figura 26 B**, $F(2, 15)=18,58$, $p<0,0001$) e do membro superior (**Figura 26 D**, $F(2,15)=26,06$, $p<0,0001$), no dia 5 para discinesia axial ($p=0,0145$) e nos dias 10 e 15 para discinesia do membro superior ($p=0,0043$ e $p=0,0273$, respectivamente). Não houve diferença para o escore individual de discinesia orofacial ($F(2,15)=1,378$, $p=0,2823$).

Observando separadamente os escores dos grupos ao longo dos dias de avaliação de discinesia (dias 1, 5, 10 e 15), encontramos que esses escores também foram maiores nos dias 5, 10 e 15 (**Figura 26 E, F, G e H**, **E (Dia 1)**: $F(2,405;36,07)=24,46$, $p<0,0001$; **F (Dia 5)**: $F(3,644;54,66)=18,24$, $p<0,0001$; **G (Dia 10)**: $F(3,671;55,06)=14,88$, $p<0,0001$; **H (Dia 15)**: $F(2,911;43,66)=13,96$, $p<0,0001$). Não houve diferença no escore de discinesia geral no primeiro dia ao longo do tempo (**Figura 26 E – Dia 1**, 2 min: 4 vs. 5, $p=0,5607$; 4 vs. 6, $p=0,9859$; 30 min: 4 vs. 5, $p=0,1324$; 4 vs. 6, $p=0,1247$; 60 min: 4 vs. 5, $p=0,0649$; 4 vs. 6, $p=0,4458$; 90 min: 4 vs. 5, $p=0,1703$; 4 vs. 6, $p=0,2056$; 120 min: 4 vs. 5, $p=0,6332$; 4 vs. 6, $p=0,3308$; 150 min: 4 vs. 5, $p=0,7182$; 4 vs. 6, $p=0,1280$).

No dia 5 (**Figura 26 F – Dia 5**) o grupo 6-OHDA/LPS/L-DOPA apresentou escores de discinesia maiores que o grupo controle ao longo do tempo, iniciando aos 30 minutos e se mantendo até 120 minutos (2 min: 4 vs. 5, $p=0,0532$; 4 vs. 6, $p=0,6922$; 30 min: 4 vs. 5, $p=0,0098$; 4 vs. 6, $p=0,7349$; 60 min: 4 vs. 5, $p=0,0413$; 4 vs. 6, $p=0,7476$; 90 min: 4 vs. 5, $p=0,0164$; 4 vs. 6, $p=0,3948$; 120 min: 4 vs. 5, $p=0,0849$; 4 vs. 6, $p=0,9093$; 150 min: 4 vs. 5, $p=0,0054$; 4 vs. 6, $p=0,4710$).

Já no 10º dia (**Figura 26 G – Dia 10**), apenas nos tempos 60 e 120 minutos houve diferença entre o grupo 6-OHDA/LPS/L-DOPA quando comparado com o controle (2 min: 4 vs. 5, $p=0,9973$; 4 vs. 6, $p=0,0204$; 30 min: 4 vs. 5, $p=0,3356$; 4 vs. 6, $p=0,0695$; 60 min: 4 vs. 5, $p=0,0135$; 4 vs. 6, $p=0,0544$; 90 min: 4 vs. 5, $p=0,0840$; 4 vs. 6, $p=0,3350$; 120 min: 4 vs. 5, $p=0,0176$; 4 vs. 6, $p=0,8739$; 150 min: 4 vs. 5, $*p=0,0542$; 4 vs. 6, $p=0,1109$).

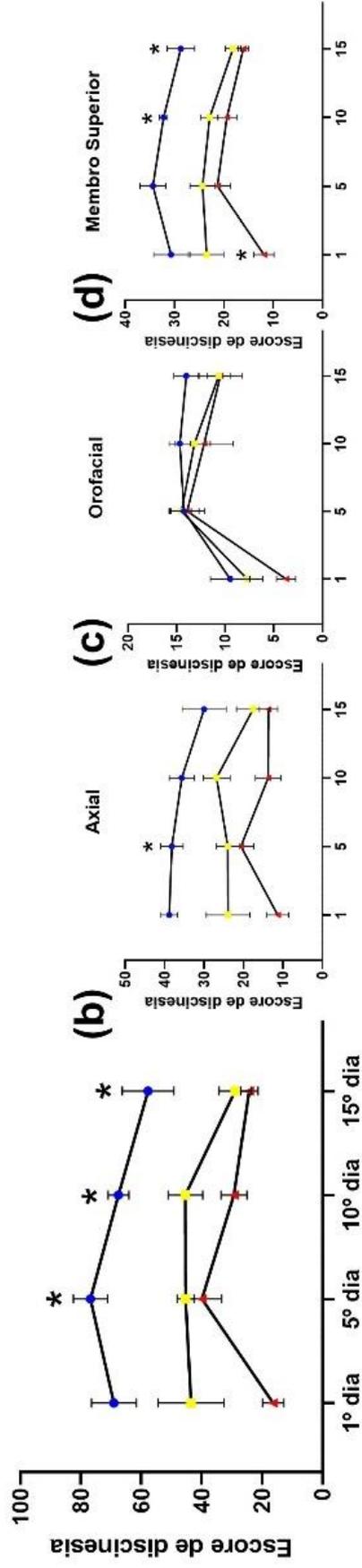
Por fim, ao 15º dia de avaliação (**Figura 26 H – Dia 15**), somente houve diferença aos 120 minutos (2 min: 4 vs. 5, $p=0,1749$; 4 vs. 6, $p=0,5084$; 30 min: 4 vs. 5, $p=0,2793$; 4 vs. 6, $p=0,6377$; 60 min: 4 vs. 5, $p=0,1901$; 4 vs. 6, $p=0,9863$; 90 min: 4 vs. 5, $p=0,0556$; 4 vs. 6, $p=0,9987$; 120 min: 4 vs. 5, $p=0,0100$; 4 vs. 6, $p=0,9863$; 150 min: 4 vs. 5, $p=0,1064$; 4 vs. 6, $p=0,9966$).

O grupo linha vermelha de baixa lesão ([6]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo amarelo, que não recebeu o estímulo inflamatório com LPS (verificar 4 vs. 6).

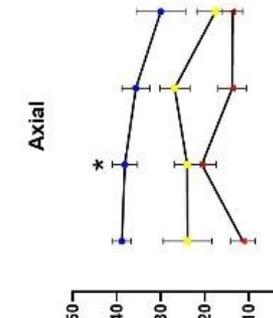
Os grupos que não receberam L-DOPA ([1]: sham, [2]: sham 6-OHDA/salina, [3]: 6-OHDA/LPS/salina) não apresentaram discinesia induzida por L-DOPA e, portanto, não foram incluídos nessa análise.

Para confirmar os resultados acerca da exacerbação da discinesia pelo LPS, repetimos o mesmo protocolo experimental com o segundo grupo de animais (**Figura 27**). Novamente confirmamos a presença da inflamação sistêmica (Apêndice), e, conforme ocorreu a administração da L-DOPA, o grupo que recebeu o estímulo com LPS previamente ao tratamento com a droga precursora de dopamina (L-DOPA), apresentou exacerbação da discinesia ($F(2,19)=12,13$; $p=0,0004$). No escore do grupo (**Figura 27 A – Todos os dias**), houve diferença entre o grupo [8]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA e o controle ([6]) nos dias 5 e 15 ($p=0,0038$ e $p=0,0051$, respectivamente). Já o grupo de baixa lesão (vermelho, [9]), não apresentou diferença significativa em relação ao grupo com lesão suficientemente alta [6]. Em relação aos escores individuais de discinesia (**Figura 27 B, C e D**), houve diferença do grupo [8]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA em relação ao grupo controle [6] nos escores de discinesia axial (**Figura 27 B**, $F(2, 19)=8,245$, $p=0,0026$) e do membro superior em todos os dias de análise (**Figura 27 D**, $F(2,19)=15,58$, $p<0,0001$), no dia 5 para discinesia axial ($p=0,0086$) e nos dias 1, 5, 10 e 15 para discinesia do membro superior ($p=0,0436$; $p=0,0008$; $p=0,0263$ e $p=0,0007$, respectivamente).

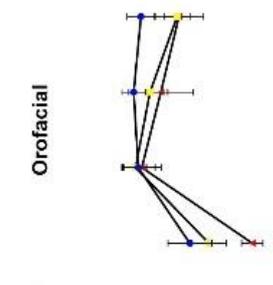
(a) Análise da Discinesia



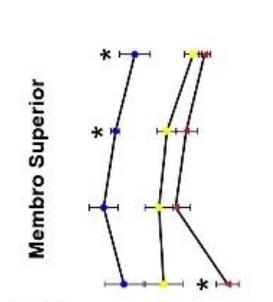
(b)



(c)



(d)

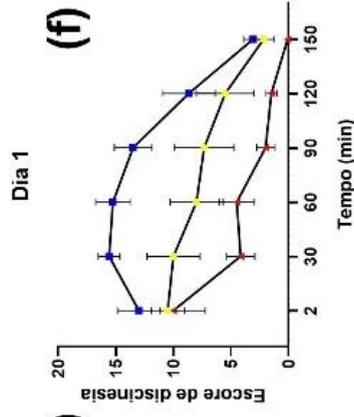


— [4]: 6-OHDA/salina/L-DOPA (n=6)

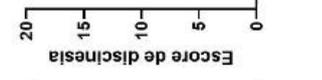
— [5]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA (n=6)

— [6]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA (baixa lesão) (n=6)

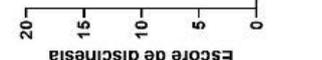
(e)



(f)



(g)



(h)

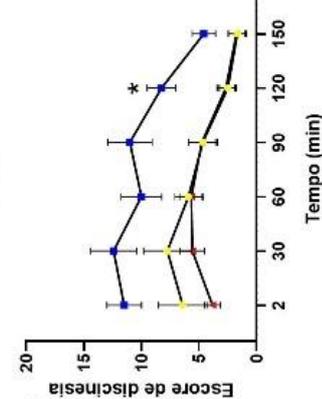


Figura 26: Análise da Discinesia induzida por L-DOPA (Grupo 1). (a) Análise dos escores dos grupos somando todos os escores individuais. (b) Análise da intensidade da discinesia axial. (c) Análise da intensidade da discinesia orofacial. (d) Análise da Intensidade da discinesia do membro superior esquerdo. (e) Análise do primeiro dia de administração da L-DOPA. (f) Análise do 5º dia. (g) Análise do 10º dia. (h) Análise do 15º dia. O grupo [5] apresentou maiores escores de discinesia em relação ao grupo [4], que desempenhava um grau “basal” de discinesia, com significância estatística nos dias 5, 10 e 15. O grupo [6] não apresentou diferença significativa em relação ao grupo [4]. ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni, com $*p < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (Grupo 4).

O escore de discinesia orofacial apresentou diferença significativa no 15º dia de análise, apenas, ($F(2,19)=8,593$, $p=0,0022$) (com $p=0,0109$). Observando separadamente os escores dos grupos ao longo dos dias de avaliação de discinesia (dias 1, 5, 10 e 15), encontramos que esses escores também foram maiores nos dias 5, 10 e 15 (**Figura 27 E, F, G e H**), **E (Dia 1)**: $F(3,212;61,02)=52,10$, $p < 0,0001$; **F (Dia 5)**: $F(3,905;74,20)=26,48$, $p < 0,0001$; **G (Dia 10)**: $F(3,675;68,82)=36,08$, $p < 0,0001$; **H (Dia 15)**: $F(3,798;72,17)=25,06$, $p < 0,0001$.

No primeiro dia de análise só ocorreu diferença significativa entre o grupo [6] e o grupo [8] no último tempo de análise (**Figura 27 E – Dia 1**, 2 min: 6 vs. 8, $p > 0,9999$; 6 vs. 9, $p=0,2854$; 30 min: 6 vs. 8, $p=0,1432$; 6 vs. 9, $p=0,0584$; 60 min: 6 vs. 8, $p=0,1383$; 6 vs. 9, $p=0,1695$; 90 min: 6 vs. 8, $p=0,3068$; 6 vs. 9, $p=0,4806$; 120 min: 6 vs. 8, $p=0,7012$; 6 vs. 9, $p=0,1862$; 150 min: 6 vs. 8, $p=0,0019$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$).

No dia 5 (**Figura 27 F – Dia 5**) o grupo [8]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA apresentou escores de discinesia maiores que o grupo controle [6] nos últimos dois tempos de análise (2 min: 6 vs. 8, $p > 0,9999$; 6 vs. 9, $p=0,7646$; 30 min: 6 vs. 8, $p=0,0959$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 60 min: 6 vs. 8, $p=0,1570$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 90 min: 6 vs. 8, $p=0,0578$; 6 vs. 9, $p=0,3279$; 120 min: 6 vs. 8, $p=0,0170$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 150 min: 6 vs. 8, $p=0,0009$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$).

Já no 10º dia (**Figura 27 G – Dia 10**), apenas nos tempos 90 e 120 minutos houve diferença entre o grupo [8]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA quando comparado com o controle [6] (2 min: 6 vs. 8, $p > 0,9999$; 6 vs. 9, $p=0,5018$; 30 min: 6 vs. 8, $p=0,6006$; 6 vs. 9, $p=0,1989$; 60 min: 6 vs. 8, $p=0,2010$; 6 vs. 9, $p=0,3223$; 90 min: 6 vs. 8, $p=0,0250$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 120 min: 6 vs. 8, $p=0,0009$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 150 min: 6 vs. 8, $p=0,2320$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$).

Por fim, ao 15º dia de avaliação (**Figura 27 H – Dia 15**), houve diferença dos 30 aos 120 minutos (2 min: 6 vs. 8, $p=0,6391$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 30 min: 6 vs. 8, $p=0,0156$; 6 vs. 9, $p=0,6699$; 60 min: 6 vs. 8, $p=0,0370$; 6 vs. 9, $p=0,3677$; 90 min: 6 vs. 8, $p=0,0035$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 120 min: 6 vs. 8, $p=0,0020$; 6 vs. 9, $p > 0,9999$; 150 min: 6 vs. 8, $p=0,3327$; 6 vs. 9, $p=0,8376$).

O grupo vermelho de baixa lesão ([9]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA) não apresentou diferença significativa em relação ao grupo amarelo [6], que não recebeu o estímulo inflamatório com LPS (verificar 6 vs. 9).

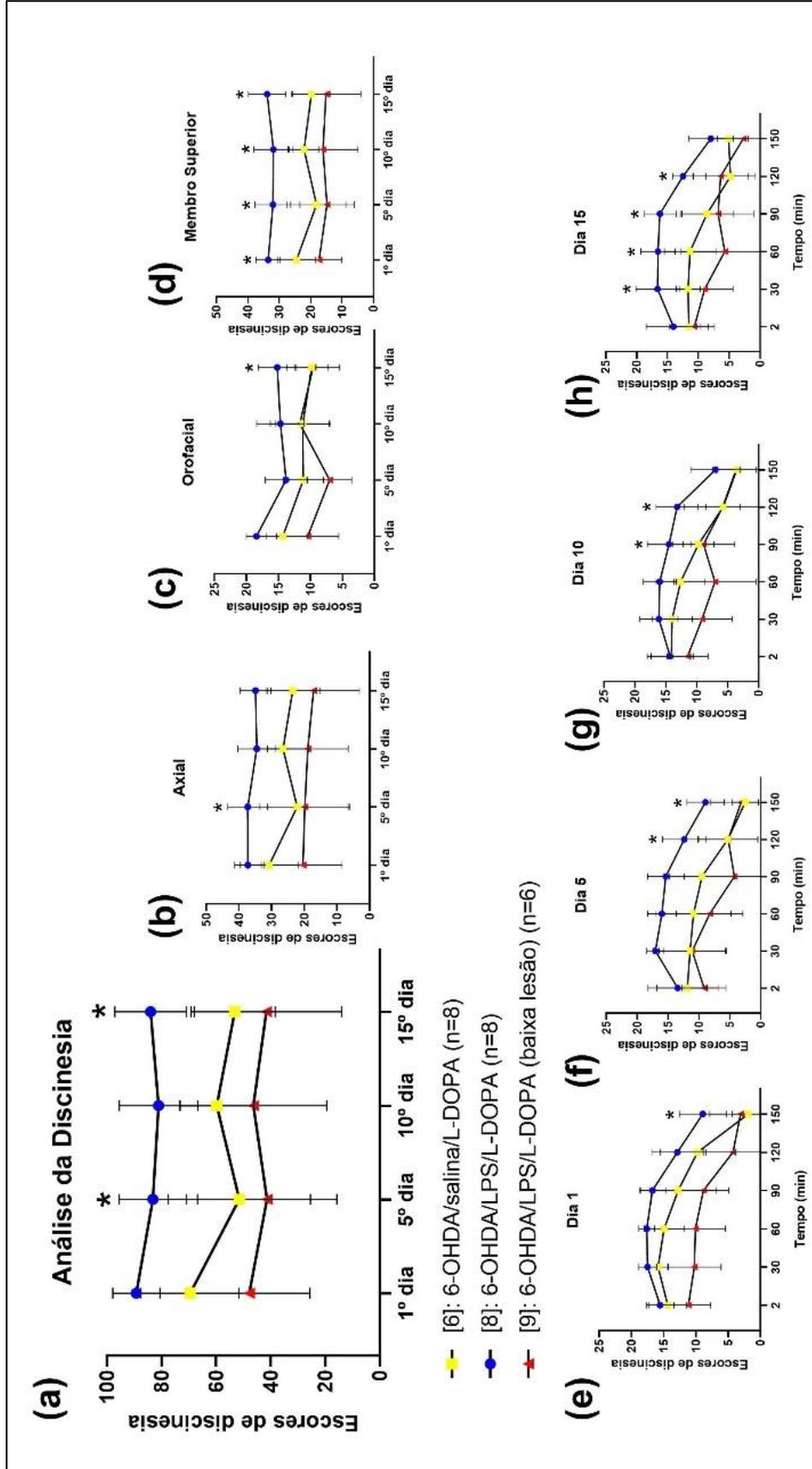


Figura 27: Análise da Discinesia induzida por L-DOPA (Grupo 2). (a) Análise dos escores dos grupos somando todos os dias. (b) Análise da intensidade discinesia axial. (c) Análise da intensidade da discinesia orofacial. (d) Análise da Intensidade da discinesia do membro superior esquerdo. (e) Análise do primeiro dia de administração da L-DOPA. (f) Análise do 5º dia. (g) Análise do 10º dia. (h) Análise do 15º dia. O grupo [8] apresentou maiores escores de discinesia em relação ao grupo [6] (controle), que desempenhava um grau “basal” de discinesia, com significância estatística nos dias 5 e 15. O grupo [9] não apresentou diferença significativa em relação ao grupo [6]. ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni, com $*p < 0,05$.

Os outros grupos de experimentação ([1]: sham, [2]: sham/salina/L-DOPA; [3]: sham/LPS/salina; [4] sham/ LPS/L-DOPA; [5]: 6-OHDA/salina, [7]: 6-OHDA/LPS/salina) não apresentaram discinesia induzida por L-DOPA e, portanto, não foram representados no gráfico dessa análise.

É visto em ambos grupos de experimentação que o LPS permitiu exacerbar a discinesia induzida por L-DOPA de maneira global, com significância estatística ao longo dos dias (e além disso, a LID se manteve exacerbada todos os dias, de maneira significativamente sustentada, demonstrando que o estímulo inflamatório mantém a prevalência do efeito discinético nesses animais.

5.4 EXPRESSÃO DE FATORES UPSTREAM DA CASCATA DO TLR4 – Grupo

1

Não houve aumento da expressão do receptor TLR4 ou MyD88 nos animais discinéticos tratados com LPS: Em relação a expressão do receptor TLR4 (**Figura 28 A**), não houve diferença entre os grupos 6-OHDA/LPS/L-DOPA e o controle ($F(2,057; 7,816)=1,309$, $p=0,3246$), bem como em nenhum dos grupos experimentais analisados.

Da mesma forma, não observamos alterações na expressão de MyD88 (**Figura 28 B**, $F(1,693; 6,432)=4,939$, $p=0,0537$) nos grupos. É possível observar que há moderada tendência de aumento de expressão dos componentes analisados nos grupos lesionados com 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA, podendo sugerir a exploração dos componentes a jusante (downstream) da cascata como algo promissor para futuras investigações.

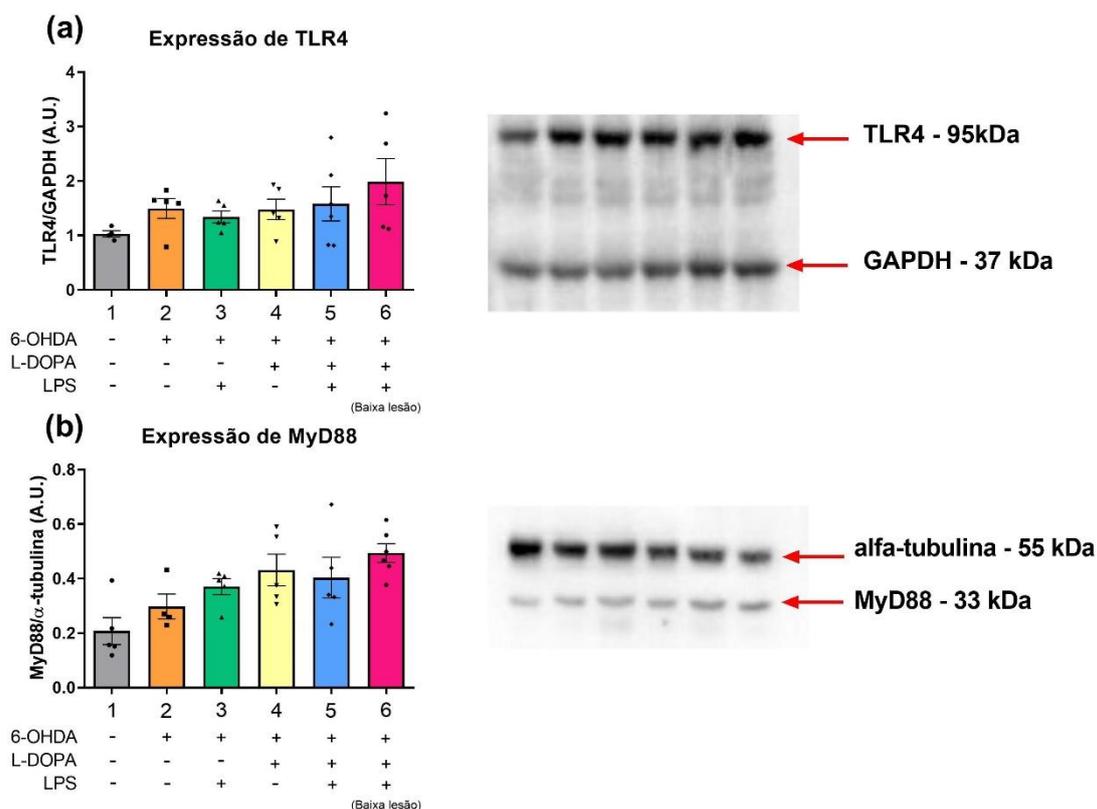


Figura 28: Análise do conteúdo de proteínas do estriado dorso-lateral lesionado, por meio da técnica de Western blot. (a) Análise da expressão de TLR4. (b) Análise da expressão de MyD88. Em (b), os grupos 4 e 6 apresentam aumento significativo da expressão de MyD88 em relação ao grupo Sham. Análises de efeitos misturados, seguido por Bonferroni, com $*p < 0,05$.

5.5 CONFIRMAÇÃO DA LESÃO PELA EXPRESSÃO DA ENZIMA TIROSINA HIDROXILASE (TH) – Grupo 1

A enzima TH é passo-limitante da cascata de síntese das catecolaminas e está presente nos neurônios dopaminérgicos da substância negra. A caracterização molecular da sua expressão, por meio da técnica de imunohistoquímica, nos indica o grau de lesão dos neurônios dopaminérgicos.

Os grupos 6-OHDA/Salina/Salina [2], 6-OHDA/Salina/LPS [3], 6-OHDA/L-DOPA [4] e 6-OHDA/LPS/L-DOPA [5] apresentaram redução da expressão de TH na substância negra em relação ao grupo Sham (**Figura 29**, $F(5, 27)=11,39$; $p < 0,0001$) (com $p=0,0025$; $p=0,0003$; $p < 0,0001$ e $p < 0,0001$; respectivamente). O grupo [6]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA (baixa lesão) não apresentou diferença na expressão de TH em relação ao grupo Sham [1] ($p=0,6697$), entretanto houve diferença em relação aos grupos 6-OHDA/Salina/LPS [3] ($p=0,0399$), 6-OHDA/L-DOPA [4] ($p=0,0045$) e 6-OHDA/LPS/L-DOPA [5] ($p=0,0132$). É possível observar

que o grupo 6-OHDA/LPS/L-DOPA (baixa lesão) [6] não apresentou grau de lesão significativo quando comparado aos demais grupos lesionados com 6-OHDA.

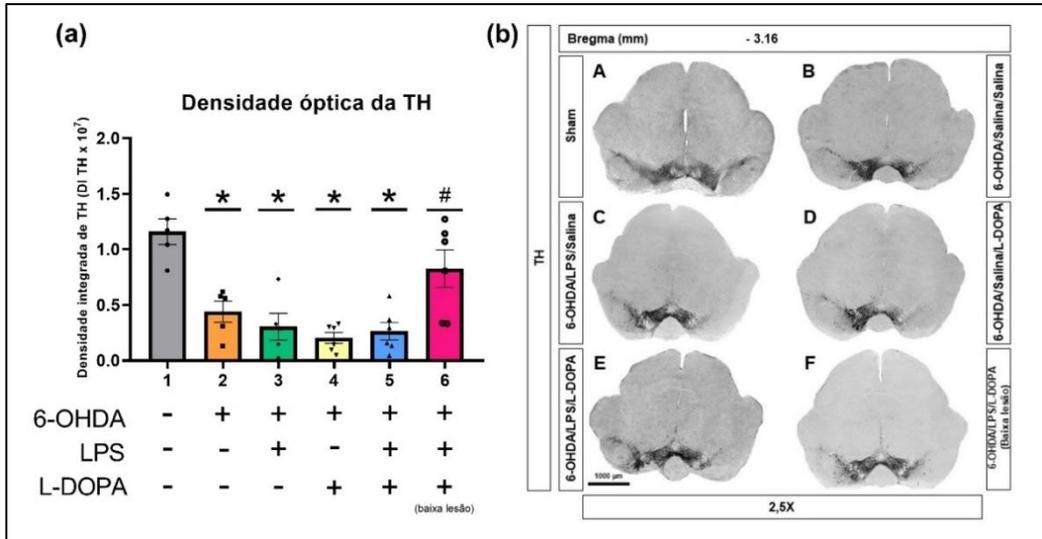


Figura 29: Quantificação da densidade óptica da Tiroxina Hidroxilase na Substância Negra compacta (a) Análise da densidade óptica de TH. (b) Figuras representativas da substância negra medial (Bregma: - 3,16). Em (a), os grupos 2, 3, 4 e 5 apresentaram redução da expressão de TH em relação ao sham. O grupo [6]: 6-OHDA/LPS/L-DOPA (baixa lesão) não apresentou diferença em relação ao Sham [1], todavia houve diferença em relação aos grupos 3, 4 e 5. ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni, com $*p < 0,05$. (b) Figuras representativas da SNc medial e seus grupos correspondentes: 1^a (Sham), 2B (6-OHDA/Salina/Salina), 3C (6-OHDA/LPS/salina), 4D (6-OHDA/salina/L-DOPA), 5E (6-OHDA/LPS/L-DOPA) e 6F (6-OHDA/LPS/L-DOPA [baixa lesão]).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo corrobora os resultados de Mulas *et al.*, (2016) que a aplicação de LPS, previamente ao início do tratamento crônico com L-DOPA, intensificou a manifestação da discinesia induzida por L-DOPA. Nossos resultados foram obtidos em camundongos C57 Black, hemiparkinsonianos. A inovação trazida neste trabalho é a abordagem bioquímica da via típica de inflamação, com envolvimento da ativação do receptor TLR4 observando se essa via faz parte dos componentes neuroinflamatórios necessários para a manifestação comportamental da LID. O tratamento crônico com L-DOPA nos grupos lesionados com 6-OHDA não aumentou a expressão do receptor TLR4 e da proteína Myd88.

6.1 CURVA DOSE-RESPOSTA LPS: INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOTORA

Este estudo tem como objetivo a padronização do modelo de exacerbação da LID por meio do uso do LPS i.p. em camundongos, de forma que promova uma inflamação sistêmica sem alterar a atividade locomotora dos animais, modificando o desenvolvimento da LID. O LPS é um inflamógeno típico usado intraperitonealmente no modelo de sepse, no qual se instala inflamação sistêmica no organismo do animal e se avalia os componentes associados a essa resposta. No trabalho de Mulas e colegas (2016) o LPS utilizado para intensificar a discinesia foi inoculado no modelo experimental de doença de Parkinson em ratos, com a dose de 2,0 mg/kg (i.p.). Dessa forma, tomamos o cuidado de estabelecer parâmetros para se avaliar o grau de inflamação induzida, sendo eles a temperatura corporal como representativo da promoção da inflamação sistêmica (HABICHT, 1981), e a locomoção (HART, 1988), avaliada através do teste do actímetro.

Para isso, avaliamos qual a dose do LPS iria instalar a inflamação nos camundongos, observando um dos sinais cardinais da inflamação, a temperatura corporal, pois trata-se de um dos componentes mensuráveis da manifestação inflamatória sistêmica (HABICHT, 1981). Outro componente avaliado foi a locomoção, pois o LPS não deve induzir uma inflamação tão intensa a ponto de diminuir a locomoção (HART, 1988).

Aqui, mensuramos a temperatura corporal do animal antes da administração do LPS (i.p.), para ser considerada a temperatura basal desses animais. Nesse experimento, observamos que as doses de 0,1; 0,2 0,5 e 2,0 mg/kg de LPS induziram uma queda significativa da temperatura corporal, em relação à temperatura basal. Conforme demonstrado por Habicht (1981), essa diminuição da temperatura corporal, uma hora após a administração i.p. de LPS, é

indicativa da manifestação de uma inflamação sistêmica. Portanto, as doses utilizadas demonstram-se adequadas para induzir a resposta inflamatória desejada nesses animais.

Além disso, os animais foram posteriormente colocados no actímetro para avaliação locomotora. Dentre todos os grupos, aqueles que receberam as doses de 0,2; 0,5 e 2,0 mg/kg de LPS i.p., apresentaram queda dos movimentos horizontais de forma significativa em relação ao grupo que recebeu salina. Em relação aos movimentos verticais, apenas o grupo 2,0 mg/kg de LPS apresentou queda significativa. A queda da locomoção horizontal desses animais demonstra que essas doses de LPS desenvolvem uma resposta inflamatória intensa nos animais, indesejada, que prejudique a locomoção.

Portanto, esse experimento nos serviu para a padronização do nosso modelo experimental de influência do LPS no qual a dose satisfatória para induzir uma resposta inflamatória aguda nos camundongos, sem prejudicar a locomoção, é a de 0,1 mg/kg de LPS.

6.2 CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL DA LESÃO ESTRIATAL COM 6-OHDA

A 6-hidroxidopamina é uma droga que possui semelhança estrutural com a dopamina. Ao ser administrada no estriado dorsolateral (10 μ g/ μ L, com 0,02% de ácido ascórbico) dos camundongos, ela é captada pelos neurônios dopaminérgicos, por afinidade ao DAT, e então libera radicais hidroxila, que promovem efeitos na cadeia respiratória mitocondrial e promove efeitos deletérios nesses neurônios (UNGERSTEDT, 1968). Conforme há a perda seletiva desses neurônios dopaminérgicos, os receptores pós-sinápticos de dopamina são sensibilizados (IANCU *et al.*, 2005). A administração do agonista dopaminérgico apomorfina (s.c., 0,5 mg/kg), que se liga aos receptores dopaminérgicos D1 e D2 (MILLAN *et al.*, 2002; JENNER; KATZENSCHLAGER, 2016) promove a estimulação dos movimentos, que ocorrerá como giros para o lado contralateral à lesão dopaminérgica (IANCU *et al.*, 2005).

Com base nesse experimento, os camundongos que apresentaram um mínimo de 2 rotações por minuto foram separados nos grupos de alta lesão, sem diferença significativa entre os escores de giros entre esses grupos. Os animais que apresentaram escores abaixo desse limite de 2 giros por minuto foram separados em outro grupo, considerado como de baixa lesão/lesão parcial. O resultado do experimento mostrou um grupo de animais que aparentemente apresentavam lesão parcial do estriado. Contudo, a lesão parcial não foi confirmada pela análise histoquímica da enzima TH na substância negra (**Figura 29**).

O teste de rotação induzida pela apomorfina apresenta controvérsias (IANCU *et al.*, 2005). Assim a interpretação foi diferente da produzida pela análise da imunohistoquímica da enzima TH.

A indicação da presença de lesão parcial e/ou total deve ser investigada pela imunohistoquímica para a enzima TH no estriado e também pela realização de outros testes de comportamento como o teste da pata, o teste do levantamento pela cauda, ou o teste do rota-rod dentre outros.

6.3 EXACERBAÇÃO DA DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA VIA INDUÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA POR LPS

Com base nos estudos pioneiros de Pavón *et al* 2006 e Cenci e Lundblad, 2007, a administração crônica de L-DOPA (i.p., 25 mg/kg com 10 mg/kg de benserazida) promove efeitos discinéticos. Podem ser observados nos camundongos movimentos orofaciais, movimentos das patas dianteiras e torção axial do tronco do animal colocando escores de 0-4 conforme a intensidade e a prevalência de tais movimentos (CENCI; LUNDBLAD, 2007; PAVÓN *et al.*, 2006). Também foi importante a avaliação a locomoção dos animais conforme a inoculação do LPS, pois o efeito motor induzido pelo LPS não deve prejudicar a avaliação dos escores da discinesia.

O grupo 6-OHDA/L-DOPA (amarelo) foi considerado como linha de base, pois representa o protocolo padrão do modelo animal hemiparkinsoniano com discinesia. Portanto, representa os escores basais de discinesia, considerados característicos do padrão de manifestação discinética promovida pelo tratamento crônico com L-DOPA. O grupo 6-OHDA/LPS/L-DOPA (azul) apresenta escores totais de discinesia intensificados, pela promoção da ação do LPS administrado com a dose de 0,1 mg/kg i.p. De maneira geral, a discinesia se manteve sustentada por mais tempo nesse grupo que recebeu o LPS como estímulo inflamatório inicial.

Em relação aos movimentos individuais, a torção axial apresentou intensificação no dia 5 de análise, enquanto os movimentos da pata dianteira foram intensificados significativamente nos dias 10 e 15 de análise. Esses dados são esperados, conforme o observado no trabalho de Mulas *et. al.*, (2016), e demonstram que o LPS foi efetivo em intensificar a manifestação da discinesia em todos os aspectos analisados no animal com lesão dopaminérgica unilateral. Dessa forma, podemos sugerir que a discinesia foi influenciada pela inflamação sistêmica como aquela induzida pela aplicação de LPS sendo um fator relevante para essa

manifestação clínica. A inflamação sistêmica seria agregada àquela detectada no sistema nervoso central após lesão dos neurônios dopaminérgicos, com ou sem tratamento com L-DOPA.

Em relação ao grupo de baixa lesão/lesão parcial (6-OHDA/LPS/L-DOPA; vermelho), não foram observadas diferenças significativas em relação ao grupo com escores basais de discinesia (grupo amarelo; 6-OHDA/L-DOPA). Porém não se pode afirmar que a presença de discinesia tenha sido influenciada pela presença do LPS. A presença de discinesia deve ser comparada com a discinesia de animais com baixa lesão/lesão parcial lesão na ausência de LPS (PAVÓN et al 2006; CENCI; LUNDBLAD, 2007; dos-SANTOS-PEREIRA *et al.*, 2021).

Nossos resultados sugerem que a discinesia induzida por L-DOPA, que mostra a presença de neuroinflamação no SNC (dos-SANTOS-PEREIRA *et al.*, 2021), é influenciada por mecanismos diferentes da neuroinflamação inicial que acompanha a patologia progressiva de morte neuronal da doença.

6.4 EXPRESSÃO DE FATORES UPSTREAM DA CASCATA DO TLR4

Em nosso modelo experimental, os camundongos lesionados com 6-OHDA, receberam aplicação única de LPS no dia anterior ao início do tratamento com L-DOPA. No último dia de tratamento com L-DOPA, o estriado dorsolateral lesionado desses animais foi removido 45 minutos após a administração da droga, e foi homogeneizado para análise por *western blot*. Não foi observada diferença para a proteína relativa ao receptor TLR4 (95 kDa) e da proteína Myd88. Complementando este experimento para observar um panorama geral, poderia ainda ter sido investigado a atividade do receptor (*binding*) ou a expressão de RNAm. Além disso, poderia ter sido feito uma análise de sequenciamento de RNAm '*single cell*' para podermos diferenciar se a expressão de TLR4 estaria afetada nas células que expressam esse receptor em altas quantidades, como astrócitos e micróglia. Seria necessário investigar os outros intermediários dessa cascata de sinalização, pois, não só ocorre amplificação das proteínas *downstream* conforme a propagação do sinal (NELSON; COX, 2014). A via do TLR4 possui congruência com diversas outras vias de sinalização, além das vias da própria família dos TLRs e, portanto, é de interesse científico continuar essa investigação. O LPS possui ligação com TLR4, mas também com TLR2 (GAY; GANGLOFF, 2007). Além disso, ambos receptores possuem a capacidade de se ligarem a DAMPs, que podem ser oriundos de vias de necrose que estão ocorrendo nos neurônios dopaminérgicos, fruto do estresse oxidativo muito observado

nessas células (SULZER; ZECCA, 2000). Outro fato que corrobora com essa perspectiva é que o TLR4 é uma via imunológica ancestral de resposta aguda, que predispõe a ativação de vias de resposta imunológica adaptativa (JANEWAY JR et al, 2007). Sua atividade se relaciona com a expressão da enzima NOS induzível em neutrófilos periféricos (ALVES-FILHO *et al.*, 2005). Na DP já se observou que há infiltração de células imunes periféricas (BROCHARD *et al.*, 2009), e que há aumento de iNOS no estriado de camundongos discinéticos (BORTOLANZA *et al.*, 2015a, 2015b).

Ainda serão necessários estudos para encontrar correlações assertivas com todas essas peças do quebra-cabeça imuno-patológico que ocorre na DP, mas ao que tudo indica, este tema parece ser um campo fértil para boa prospecção investigativa dentro da ciência.

7 CONCLUSÃO

O modelo de intensificação da discinesia por meio do uso de injeção intraperitoneal de 0,1 mg/kg de LPS em camundongos hemiparkinsonianos, antes de iniciar o tratamento crônico com L-DOPA, foi adequado e reprodutível para análise dos objetivos. Em suma, nossos dados confirmam a presença da neuroinflamação paralela na LID, que predispõe a manifestação desse efeito colateral da droga. A via do TLR4 é promissora de investigação para análises do perfil neuroinflamatório que acompanha a discinesia induzida por L-DOPA que ocorre dentro do perfil neuropatológico da doença de Parkinson.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVAREZ-ERVITI, L. *et al.*, Chaperone-mediated autophagy markers in Parkinson disease brains. **Archives of Neurology**, v. 67, n. 12, p. 1464–1472, dez. 2010.
2. ALVES-FILHO, J. C. *et al.*, Failure of neutrophil migration toward infectious focus in severe sepsis: a critical event for the outcome of this syndrome. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 223–226, 2005.
3. ANDÉN, N.-E. *et al.*, Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons. **Life sciences**, v. 3, n. 6, p. 523–530, 1964.
4. ANDÉN, Nils-Eric *et al.*, Further evidence for the presence of nigro-neostriatal dopamine neurons in the rat. **American Journal of Anatomy**, v. 116, n. 1, p. 329–333, 1965.
5. ANDERSON, K. V; BOKLA, L.; NIISLEIN-VOLHARD, C. **Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: The Induction of Polarity by the To// Gene Product**Cell. [s.l: s.n.].
6. ANDERSON, K. V; JIIRGENS, G.; NIISLEIN-VOLHARD, C. **Establishment of Dorsal-Ventral Polarity in the Drosophila Embryo: Genetic Studies on the Role of the To// Gene Product**. [s.l: s.n.].
7. ANGELA CENCI, M.; LUNDBLAD, M. Ratings of l-dopa-induced dyskinesia in the unilateral 6-ohda lesion model of parkinson's disease in rats and mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 1–23, 1 out. 2007.
8. ANGLADE, P. *et al.*, **Histology and Histopathology Apoptosis and autophagy in negral neurons of patients with Parkinson's disease**Histol Histopathol. [s.l: s.n.].
9. ANGOT, E. *et al.*, Are synucleinopathies prion-like disorders? **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 11, p. 1128–1138, 1 nov. 2010.
10. ARA, J. *et al.*, **Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxyxynitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)**Medical Sciences. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org.>.
11. ARAVIND, L.; DIXIT, V. M.; KOONIN, E. V. **The domains of death: evolution of the apoptosis machinery**. [s.l: s.n.].
12. BANDOPADHYAY, R. *et al.*, **Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies for Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: A Perspective Through Preclinical and Clinical Evidence**. **Frontiers in Pharmacology**Frontiers Media S.A., , 7 abr. 2022.
13. BARNUM, C. J. *et al.*, Exogenous corticosterone reduces l-DOPA-induced dyskinesia in the hemi-parkinsonian rat: Role for interleukin-1 β . **Neuroscience**, v. 156, n. 1, p. 30–41, 22 set. 2008.
14. BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **NEUROSCIENCE - Exploring the Brain**. [s.l: s.n.]. v. 3
15. BEITZ, J. M. Parkinson's disease: a review. **Frontiers in Bioscience**, p. 65–74, 2014.
16. BÉZARD, E. *et al.*, **Attenuation of levodopa-induced dyskinesia by normalizing dopamine D 3 receptor function**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nature.com/naturemedicine>>.
17. BEZARD, E.; BROTCHE, J. M.; GROSS, C. E. **PATHOPHYSIOLOGY OF LEVODOPA-INDUCED DYSKINESIA: POTENTIAL FOR NEW THERAPIES**. **Neuroscience**, v. 2, p. 577–588, 2001.
18. BLOCQ, Paul; MARINESCO, Gheorghe. Sur un cas de tremblement parkinsonien hémiplégique symptomatique d'une tumeur du pédoncule cérébral. (No Title), 1893.
19. BOJE, K. M.; ARORA, P. K. **Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death**. [s.l: s.n.].
20. BOKA, G. *et al.*, **HHROSCIENCE LETTERS Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parldnson's disease**. [s.l: s.n.].
21. BOLAM, J. P.; PISSADAKI, E. K. Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. **Movement Disorders**, v. 27, n. 12, p. 1478–1483, 1 out. 2012.
22. BORRAJO, A. *et al.*, Microglial TNF- α mediates enhancement of dopaminergic degeneration by brain angiotensin. **GLIA**, v. 62, n. 1, p. 145–157, jan. 2014.
23. BORTOLANZA, M. *et al.*, Glial activation is associated with l-DOPA induced dyskinesia and blocked by a nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 73, p. 377–387, 1 jan. 2015a.
24. BORTOLANZA, M. *et al.*, Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of parkinson's disease induced by L-DOPA? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1672, p. 1–13, 5 jul. 2015b.

25. BORTOLANZA, M. *et al.*, **Tetracycline repurposing in neurodegeneration: focus on Parkinson's disease.** *Journal of Neural Transmission* Springer-Verlag Wien, , 1 out. 2018.
26. BOSE, A.; BEAL, M. F. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, v. 139, p. 216–231, 1 out. 2016.
27. BROCHARD, V. *et al.*, Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. *Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 1, p. 182–192, 5 jan. 2009.
28. BRUNDIN, P. *et al.*, Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nature Reviews - Neuroscience*, v. 9, p. 741–745, 2008.
29. BRUNDIN, P.; MELKI, R.; KOPITO, R. Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010 11:4, v. 11, n. 4, p. 301–307, abr. 2010.
30. BURRÉ, J. **The synaptic function of α -synuclein.** *Journal of Parkinson's Disease* IOS Press, , 21 nov. 2015.
31. CALABRESI, P. *et al.*, **Direct and indirect pathways of basal ganglia: A critical reappraisal.** *Nature Neuroscience* Nature Publishing Group, , 2014.
32. CARLSSON, A.; LINDQVIST, M.; MAGNUSSON, T. 3,4-Dihydroxyphenylalanine and 5-Hydroxytryptophan as Reserpine Antagonists. *Nature*, v. 180, p. 1200–1200, 30 nov. 1957.
33. CARLSSON, A. The neurochemical circuitry of schizophrenia. *Pharmacopsychiatry*, v. 39, n. S 1, p. 10-14, 2006.
34. CARTA, A. R. *et al.*, **1-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role?** *European Journal of Neuroscience* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2017a.
35. CARTA, A. R. *et al.*, **1-DOPA-induced dyskinesia and neuroinflammation: do microglia and astrocytes play a role?** *European Journal of Neuroscience* Blackwell Publishing Ltd, , 1 jan. 2017b.
36. CARTA, M. *et al.*, Dopamine released from 5-HT terminals is the cause of L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. *Brain*, v. 130, n. 7, p. 1819–1833, 2007.
37. CARTA, M.; BEZARD, E. Contribution of pre-synaptic mechanisms to 1-DOPA-induced dyskinesia. *Neuroscience*, v. 198, p. 245–251, 15 dez. 2011.
38. CHARCOT, Jean Martin. **Leçons sur, les maladies du système nerveux.** Lecrosnier et Babé, 1886.
39. CHAO, C. C. *et al.*, Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *The Journal of Immunology*, v. 149, n. 8, p. 2736–2741, 15 out. 1992.
40. CHOI, D. K. *et al.*, Ablation of the inflammatory enzyme myeloperoxidase mitigates features of Parkinson's disease in mice. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 28, p. 6594–6600, 13 jul. 2005.
41. CHU, Y. *et al.*, Alterations in lysosomal and proteasomal markers in Parkinson's disease: Relationship to alpha-synuclein inclusions. *Neurobiology of Disease*, v. 35, n. 3, p. 385–398, set. 2009.
42. CILIA, R. *et al.*, The modern pre-levodopa era of Parkinson's disease: insights into motor complications from sub-Saharan Africa. *Brain*, v. 137, n. 10, p. 2731–2742, 1 out. 2014.
43. COLLINS, L. M. *et al.*, **Contributions of central and systemic inflammation to the pathophysiology of Parkinson's disease.** *Neuropharmacology* Elsevier Ltd, , 2012.
44. COTZIAS, G. C.; PAPAVALIIOU, P. S.; GELLENE, R. Modifications of Parkinsonism - Chronic Treatment with L-DOPA. *The New England Journal of Medicine*, v. 280, n. 7, p. 337–345, 1969.
45. CROCKER, C. E. *et al.*, JNK inhibition protects dopamine neurons and provides behavioral improvement in a rat 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *ACS Chemical Neuroscience*, v. 2, n. 4, p. 207–212, 20 abr. 2011.
46. DAMIER, P. *et al.*, **GLUTATHIONE PEROXIDASE, GLIAL CELLS AND PARKINSON'S DISEASE** *Neuroscience*. [s.l: s.n.].
47. DAMIER, P. *et al.*, **The substantia nigra of the human brain II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease** *Brain*. [s.l: s.n.].
48. DAHLSTROM, Annica. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons. *Acta physiol. scand.*, v. 62, n. 232, p. 1-55, 1964.
49. DE VIRGILIO, A. *et al.*, **Parkinson's disease: Autoimmunity and neuroinflammation.** *Autoimmunity Reviews* Elsevier B.V., , 1 out. 2016.
50. DEHAY, B. *et al.*, Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease. *Journal of Neuroscience*, v. 30, n. 37, p. 12535–12544, 15 set. 2010.

51. DEL-BEL, E. *et al.*, **L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key elements?** *Synapse* John Wiley and Sons Inc., , 1 dez. 2016a.
52. DEL-BEL, E. *et al.*, **L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease: Are neuroinflammation and astrocytes key elements?** *Synapse* John Wiley and Sons Inc., , 1 dez. 2016b.
53. DENG, L. *et al.*, **Activation of the IB Kinase Complex by TRAF6 Requires a Dimeric Ubiquitin-Conjugating Enzyme Complex and a Unique Polyubiquitin Chain through covalent modification by Ub. Ubiquitination of a protein is carried out by an enzymatic cascade composed of E1 (Ub activating enzyme), E2 (Ub-conjugating enzyme), and E3 (Ub protein ligase). Ub is first activated by E1 in the presence of ATP to form a high energyCell.** [s.l: s.n.].
54. DICKSON, D. W. *et al.*, **Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria.** *The Lancet Neurology* Lancet Publishing Group, , 2009.
55. DIJKSTRA, A. A. *et al.*, **Stage-dependent neuronal loss in incidental Lewy body and parkinson's disease.** *Movement Disorders*, v. 29, n. 10, p. 1244–1251, 1 set. 2014.
56. DORSEY, E. R. *et al.*, **Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030.** *Neurology*, v. 68, n. 5, p. 384–386, 30 jan. 2007.
57. DOS SANTOS PEREIRA, M. *et al.*, **Contributive Role of TNF- α to L-DOPA-Induced Dyskinesia in a Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson's Disease.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 11, p. 617085, 11 jan. 2021.
58. DOS SANTOS PEREIRA, M. *et al.*, **Doxycycline attenuates L-DOPA-induced dyskinesia through an anti-inflammatory effect in a hemiparkinsonian mouse model.** *Frontiers in Pharmacology*, v. 13, 23 nov. 2022.
59. EMMANOUILIDOU, E.; STEFANIS, L.; VEKRELLIS, K. **Cell-produced α -synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome.** *Neurobiology of Aging*, v. 31, n. 6, p. 953–968, jun. 2010.
60. FAHN, S. **Levodopa in the treatment of Parkinson's disease.** *Journal of Neural Transmission*, v. 71, p. 1–15, 2006.
61. FARKAS, E. *et al.*, **Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease.** *Springer*, v. 100, p. 395–402, 2000.
62. FASANO, S. *et al.*, **Inhibition of Ras-guanine nucleotide-releasing factor 1 (Ras-GRF1) signaling in the striatum reverts motor symptoms associated with L-dopa-induced dyskinesia.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 107, n. 50, p. 21824–21829, 14 dez. 2010.
63. FEARNLEY, J. M.; LEES, A. J. **AGEING AND PARKINSON'S DISEASE: SUBSTANTIA NEGRA REGIONAL SELECTIVITY** *Brain*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://brain.oxfordjournals.org/>>.
64. FELLNER, L. *et al.*, **Toll-like receptor 4 is required for α -synuclein dependent activation of microglia and astroglia.** *GLIA*, v. 61, n. 3, p. 349–360, mar. 2013.
65. FESIK, S. W. **Review Insights into Programmed Cell Death through Structural Biology** *Cell*. [s.l: s.n.].
66. FEYDER, M.; BONITO-OLIVA, A.; FISONE, G. **L-DOPA-induced dyskinesia and abnormal signaling in striatal medium spiny neurons: Focus on dopamine D1 receptor-mediated transmission.** *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, out. 2011.
67. FUNK, C. **Synthesis of dl-3: 4-Dihydroxyphenylalanine.** [s.l: s.n.].
68. GAO, X.; REN, C.; ZHAO, H. **Protective effects of ischemic postconditioning compared with gradual reperfusion or preconditioning.** *Journal of Neuroscience Research*, v. 86, n. 11, p. 2505–2511, 15 ago. 2008.
69. GARCÍA BUENO, B. *et al.*, **Innate immune receptor Toll-like receptor 4 signalling in neuropsychiatric diseases.** *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* Elsevier Ltd, , 1 maio 2016.
70. GAY, N. J.; GANGLOFF, M. **Structure and function of toll receptors and their ligands.** *Annual Review of Biochemistry*, 2007.
71. GAY, N. J.; KEITH, F. J. **Drosophila Toll and IL-1 receptor.** *Nature*, v. 351, p. 355–356, 1991.
72. GERFEN, C. R. *et al.*, **D1 and D2 Dopamine Receptor-Regulated Gene Expression of Striatonegrial and Striatopallidal Neurons.** *Reports*, v. 250, p. 1429–1432, 1990.
73. GIBB, W. R. G. **Melanin, tyrosine hydroxylase, calbindin and substance P in the human midbrain and substantia nigra in relation to nigrostriatal projections and differential neuronal susceptibility in Parkinson's disease** *Brain Research*. [s.l: s.n.].
74. GLEZER, I. *et al.*, **Modulation of the Innate Immune Response by NMDA Receptors Has Neuropathological Consequences.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>>.

75. GLOIRE, Geoffrey; LEGRAND-POELS, Sylvie; PIETTE, Jacques. NF- κ B activation by reactive oxygen species: fifteen years later. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 11, p. 1493-1505, 2006.
76. GOETZ, Christopher G.; BONDUELLE, Michel; GELFAND, Toby. **Charcot: constructing neurology**. Oxford University Press, USA, 1995.
77. GOLAN, DAVID. E. *et al.*, Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. p. xxiv,952-xxiv,952, 2009.
78. GOLDSTEIN, M. *et al.*, The effects of ventromedial tegmental lesions on the biosynthesis of catecholamines in the striatum. **Life Sciences**, v. 5, n. 23, p. 2171-2176, 1966.
79. GREENGARD, Paul. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1024-1030, 2001.
80. GUIGONI, C. *et al.*, **Pathogenesis of levodopa-induced dyskinesia: Focus on D1 and D3 dopamine receptors**. Parkinsonism and Related Disorders. **Anais...**jun. 2005.
81. HABICHT, G. S. **BODY TEMPERATURE IN NORMAL AND ENDOTOXIN-TREATED MICE OF DIFFERENT AGES**Mechanisms of Ageing and Development. [s.l: s.n.].
82. HALLIDAY, G. M. *et al.*, **Neuropathology underlying clinical variability in patients with synucleinopathies**. **Acta Neuropathologica**, ago. 2011.
83. HANROTT, K. *et al.*, Differential activation of PKC δ in the substantia nigra of rats following striatal or nebral 6-hydroxydopamine lesions. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1086-1096, 1 mar. 2008.
84. HART, B. L. **Biological Basis of the Behavior of Sick Animals****Neuroscience & Biobehavioral Reviews**. [s.l.] ~ Pergamon Press plc, 1988.
85. HASHIMOTO, C.; HUDSON, K. L.; ANDERSON, K. V. **The Toll Gene of Drosophila, Required for Dorsal-Ventral Embryonic Polarity, Appears to Encode a Transmembrane Protein****Cell**. [s.l: s.n.].
86. HEIKKILA, R.; COHEN, G. Further Studies on the Generation of Hydrogen Peroxide by 6-Hydroxydopamine. **Molecular Pharmacology**, v. 8, n. 2, 1972.
87. HIRSCH, E. C. Oxidative Stress and Neuroprotection. **Journal of Neural Transmission - Springer Wien New York**, p. 201-204, 2006.
88. HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. **Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? The Lancet Neurology**, abr. 2009.
89. IACONO, D. *et al.*, Parkinson disease and incidental Lewy body disease: Just a question of time? **Neurology**, v. 85, n. 19, p. 1670-1679, 10 nov. 2015.
90. IANCU, R. *et al.*, Behavioral characterization of a unilateral 6-OHDA-lesion model of Parkinson's disease in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 162, n. 1, p. 1-10, 1 jul. 2005.
91. ISCHIROPOULOS, H. Oxidative Modifications of alpha-synuclein. **New York Academy of Sciences**, v. 991, p. 93-100, 2003.
92. JAMES SURMEIER, D.; OBESO, J. A.; HALLIDAY, G. M. Parkinson's disease is not simply a prion disorder. **Journal of Neuroscience**, v. 37, n. 41, p. 9799-9807, 11 out. 2017.
93. JANEWAY, C. A. **Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology**. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. **Anais...**1989.
94. JANEWAY JR, C. A. *et al.*, **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. [s.l: s.n.].
95. JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368-376, 1 abr. 2008.
96. JANKOVIC, J.; POEWE, W. **Therapies in Parkinson's disease**. **Current Opinion in Neurology**, ago. 2012.
97. JANSSENS, S.; BEYART, R. Review Functional Diversity and Regulation of Different Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase (IRAK) Family Members. **Cell Press**, v. 11, p. 293-302, 2003.
98. JENNER, P. **Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia**. **Nature Reviews Neuroscience**, set. 2008.
99. JENNER, Peter; OLANOW, C. Warren. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 6 Suppl 3, p. 161S-170S, 1996.
100. JENNER, P.; KATZENSCHLAGER, R. Apomorphine - pharmacological properties and clinical trials in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 33, p. S13-S21, 1 dez. 2016.
101. JOU, I. *et al.*, Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 5, p. 1619-1630, 2006.
102. JUNIOR, N. C. F. *et al.*, **Cannabidiol and Cannabinoid Compounds as Potential Strategies for Treating Parkinson's Disease and L-DOPA-Induced Dyskinesia**. **Neurotoxicity Research**Springer, , 1 jan. 2020.
103. KANAYAMA, A. *et al.*, **TAB2 and TAB3 Activate the NF-B Pathway through Binding to Polyubiquitin Chains the problem of how**

- IKK is activated by diverse signals. Among the stimulatory pathways that activate IKK, those emanating from the proinflammatory cytokines***Molecular Cell*. [s.l: s.n.].
104. KANEKO, Yoko S. *et al.*, Microglial activation in neuroinflammation: implications for the etiology of neurodegeneration. *Neurodegenerative Diseases*, v. 10, n. 1-4, p. 100-103, 2012.
105. KAUSHIK, S.; CUERVO, A. M. **Proteostasis and aging**. *Nature Medicine* Nature Publishing Group, , 8 dez. 2015.
106. KEMPADOO, K. A. *et al.*, Dopamine release from the locus coeruleus to the dorsal hippocampus promotes spatial learning and memory. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 51, p. 14835–14840, 20 dez. 2016.
107. KIGERL, K. A. *et al.*, Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry**, v. 102, n. 1, p. 37–50, jul. 2007.
108. KNOTT, C.; STERN, G.; WILKIN, G. P. Inflammatory regulators in Parkinson's disease: iNOS, lipocortin-1, and cyclooxygenases-1 and -2. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 724–739, 2000.
109. KOLLEWE, C. *et al.*, Sequential Autophosphorylation Steps in the Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 Regulate its Availability as an Adapter in Interleukin-1 Signaling. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 7, p. 5227–5236, 13 fev. 2004.
110. KWON, D. K. *et al.*, **Levodopa-Induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Pathogenesis and Emerging Treatment Strategies**. *CellsMDPI*, , 1 dez. 2022.
111. LEE, C. S.; SAUERI, H.; BJT, A. **DOPAMINERGIC NEURONAL DEGENERATION AND MOTOR IMPAIRMENTS FOLLOWING AXON TERMINAL LESION BY INTRASTRIATAL 6-HYDROXYDOPAMINE IN THE RAT***Neuroscience*. [s.l: s.n.].
112. LEHNARDT, S. *et al.*, **Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway***Harvard Medical School*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1432609100>.
113. LEWY, F. H. Zue Pathologischen Anatomie der Paralysis Agitans. *Detsch Zeitschr fur Nervenhaeilkunde*, v. 50, p. 50, 1913.
114. LEOW-DYKE, S. *et al.*, **Neuronal toll-like receptor 4 signaling induces brain endothelial activation and neutrophil transmigration in vitro**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.jneuroinflammation.com/content/9/1/230>.
115. LI, S. *et al.*, **IRAK-4: A novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.082100399>.
116. LIN, L. F. H. *et al.*, GDNF: a Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons. **Science**, v. 260, n. 5111, p. 1130–1132, 1993.
117. LIN, Michael T.; BEAL, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 787-795, 2006.
118. LINDENBACH, D. *et al.*, The role of primary motor cortex (M1) glutamate and GABA signaling in L-DOPA-induced dyskinesia in parkinsonian rats. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 38, p. 9873–9887, 21 set. 2016.
119. LINDGREN, H. S. *et al.*, L-DOPA-induced dopamine efflux in the striatum and the substantia nigra in a rat model of Parkinson's disease: Temporal and quantitative relationship to the expression of dyskinesia. **Journal of Neurochemistry**, v. 112, n. 6, p. 1465–1476, mar. 2010.
120. LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of parkinson's disease: dopamine, vesicles and α -synuclein. **Nature Reviews Neuroscience** **2002 3:12**, v. 3, n. 12, p. 932–942, 2002.
121. MA, X.; HOVY, E. End-to-end Sequence Labeling via Bi-directional LSTM-CNNs-CRF. **54th Annual Meeting of the Association for Computational Linguistics, ACL 2016 - Long Papers**, v. 2, p. 1064–1074, 4 mar. 2016.
122. MARSDEN, C. D.; FAHN, S. Problems in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, p. 1–7, 1 jan. 1981.
123. MARTINEZ-VICENTE, M. *et al.*, Dopamine-modified α -synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 777–778, 1 fev. 2008.
124. MCGEER, P. L. *et al.*, Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285–1285, 1 ago. 1988.
125. MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity**. [s.l: s.n.].

126. MILLAN, M. J. et al. Differential actions of antiparkinson agents at multiple classes of monoaminergic receptor. I. A multivariate analysis of the binding profiles of 14 drugs at 21 native and cloned human receptor subtypes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 303, n. 2, p. 791–804, 1 nov. 2002.
127. MOEHLE, M. S.; WEST, A. B. **M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally?** **Neuroscience** Elsevier Ltd, , 7 ago. 2015.
128. MOGI, M. et al., Tumor necrosis factor- α (TNF- α) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neuroscience Letters**, v. 165, n. 1–2, p. 208–210, 3 jan. 1994a.
129. MOGI, M. et al., Interleukin-1 β , interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor- α are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neuroscience Letters**, v. 180, n. 2, p. 147–150, 24 out. 1994b.
130. MOGI, M. et al., **Brain B2-microglobulin levels are elevated in the striatum in Parkinson's disease** **J Neural Transm.** [s.l: s.n.].
131. MOGI, M. et al., Brain β 2-microglobulin levels are elevated in the striatum in Parkinson's disease levels are elevated in the striatum in Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission - Parkinson's Disease and Dementia Section**, v. 9, n. 1, p. 87–92, fev. 1995b.
132. MOGI, M. et al., Transforming growth factor- β 1 levels are elevated in the striatum and in ventricular cerebrospinal fluid in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 193, n. 2, p. 129–132, 30 jun. 1995c.
133. MOGI, M. et al., Interleukin-2 but not basic fibroblast growth factor is elevated in parkinsonian brain. **Journal of Neural Transmission**, v. 103, n. 8–9, p. 1077–1081, 1996.
134. MOGI, M. et al., **Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from Parkinsonian brain** **J Neural Transm.** [s.l: s.n.].
135. MOLTENI, M.; GEMMA, S.; ROSSETTI, C. **The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. Mediators of Inflammation** Hindawi Limited, , 2016.
136. MOSHAROV, E. V. et al., Interplay between Cytosolic Dopamine, Calcium, and α -Synuclein Causes Selective Death of Substantia Nigra Neurons. **Neuron**, v. 62, n. 2, p. 218–229, 30 abr. 2009.
137. MULAS, G. et al., Differential induction of dyskinesia and neuroinflammation by pulsatile versus continuous L-DOPA delivery in the 6-OHDA model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 286, p. 83–92, 1 dez. 2016.
138. MUÑOZ, A. et al., Serotonin neuron-dependent and -independent reduction of dyskinesia by 5-HT1A and 5-HT1B receptor agonists in the rat Parkinson model. **Experimental Neurology**, v. 219, n. 1, p. 298–307, set. 2009.
139. MURIEL, M.-P. et al., **Levodopa Induces a Cytoplasmic Localization of D1 Dopamine Receptors in Striatal Neurons in Parkinson's Disease.** [s.l: s.n.].
140. NAGYOSZI, P. et al., Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. **Neurochemistry International**, v. 57, n. 5, p. 556–564, nov. 2010.
141. NALLS, M. A. et al., Large-scale meta-analysis of genome-wide association data identifies six new risk loci for Parkinson's disease. **Nature Genetics** 2014 46:9, v. 46, n. 9, p. 989–993, 1 set. 2014.
142. NEVES, K. R. T. et al., Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2015, 2015.
143. NOELKER, C. et al., Toll like receptor 4 mediates cell death in a mouse MPTP model of Parkinson disease. **Scientific Reports**, v. 3, 2013.
144. O'CONNOR, J. C. et al., Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase activation in mice. **Molecular Psychiatry** 2009 14:5, v. 14, n. 5, p. 511–522, 15 jan. 2008.
145. OLSON, J. K.; MILLER, S. D. **Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs 1** **The Journal of Immunology.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/173/6/3916/1189450/3916.pdf>>.
146. PADOVAN-NETO, F. E. et al., Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, n. 3, p. 927–935, 31 mar. 2009.
147. PADOVAN-NETO, F. E. et al., Nitric oxide synthase inhibitor improves de novo and long-term L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian rats. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, n. JUNE 2011, p. 10172, 10 jun. 2011.

148. PADOVAN-NETO, F. E. *et al.*, Facilitation of Corticostriatal Transmission following Pharmacological Inhibition of Striatal Phosphodiesterase 10A: Role of Nitric Oxide-Soluble Guanylyl Cyclase-cGMP Signaling Pathways. **Journal of Neuroscience**, v. 35, n. 14, p. 5781–5791, 8 abr. 2015.
149. PAGANO, G.; YOUSAF, T.; POLITIS, M. **PET Molecular Imaging Research of Levodopa-Induced Dyskinesias in Parkinson's Disease. Current Neurology and Neuroscience Reports** Current Medicine Group LLC 1, , 1 nov. 2017.
150. PANARO, M. A. *et al.*, Expression of TLR4 and CD14 in the central nervous system (CNS) in a MPTP mouse model of Parkinson's-like disease. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 30, n. 4, p. 729–740, dez. 2008.
151. PANDEY, S.; SRIVANITCHAPOOM, P. Levodopa-induced dyskinesia: Clinical features, pathophysiology, and medical management. **Annals of Indian Academy of Neurology**, v. 20, n. 3, p. 190–198, 1 jul. 2017.
152. PARKINSON, J. **An Essay on the Shaking Palsy Member of the Royal College of Surgeons PREFACEJ Neuropsychiatry Clin Neurosci**. [s.l: s.n.].
153. PAVÓN, N. *et al.*, ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 1, p. 64–74, 1 jan. 2006.
154. PEARSON, C. M.; WOOD, F. D. Studies of Polyarthritus and Other Lesions Induced in Rats by Injection of Mycobacterial Adjuvant. I. General Clinical and Pathologic Characteristics and Some Modifying Factors. **ARTHRITIC LESIONS FROM MYCOBACTERIA**, p. 440–459, 1959.
155. PHANE HUNOT, S. *et al.*, **FcR2/CD23 Is Expressed in Parkinson's Disease and Induces, In Vitro, Production of Nitric Oxide and Tumor Necrosis Factor-in Glial Cells**. [s.l: s.n.].
156. PICCONI, B. *et al.*, Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature Neuroscience**, v. 6, n. 5, p. 501–506, 1 maio 2003.
157. PISANU, A. *et al.*, Neuroinflammation in L-DOPA-induced dyskinesia: beyond the immune function. **Journal of Neural Transmission** **2018 125:8**, v. 125, n. 8, p. 1287–1297, 14 mar. 2018.
158. PISSADAKI, E. K.; BOLAM, J. P. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: Clues to susceptibility in Parkinson's disease. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 7, n. FEB, p. 40680, 20 fev. 2013.
159. POCOCK, J. M.; KETTENMANN, H. **Neurotransmitter receptors on microglia. Trends in Neurosciences**, out. 2007.
160. POEWE, W. *et al.*, Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 1–21, 23 mar. 2017.
161. POIRIER, L. J.; SOURKES, T. L. Influence of the substantia nigra on the catecholamine content of the striatum. **Brain**, v. 88, n. 1, p. 181–192, 1965.
162. POLITIS, M. *et al.*, Serotonergic Neurons Mediate Dyskinesia Side Effects in Parkinson's Patients with Neural Transplants. p. 38–46, 2010.
163. POLITIS, M. *et al.*, Graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease: High striatal serotonin/dopamine transporter ratio. **Movement Disorders**, v. 26, n. 11, p. 1997–2003, set. 2011.
164. POLTORAK, A. *et al.*, Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: Mutations in Tlr4 gene. **Science**, v. 282, n. 5396, p. 2085–2088, 11 dez. 1998.
165. PRZEDBORSKI, S. *et al.*, Peripheral and central pharmacokinetics of apomorphine and its effect on dopamine metabolism in humans. **Movement Disorders**, v. 10, n. 1, p. 28–36, 1 jan. 1995.
166. PRZEDBORSKI, S. *et al.*, **Oxidative post-translational modifications of a-synuclein in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mouse model of Parkinson's disease** **637±640 Journal of Neurochemistry**. [s.l: s.n.].
167. PRZEDBORSKI, S.; ISCHIROPOULOS, H. Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Weapons of Neuronal Destruction in Models of Parkinson's Disease. **<https://home.liebertpub.com/ars>**, v. 7, n. 5–6, p. 685–693, 12 maio 2005.
168. RANSOHOFF, R. M. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. **Science**, v. 353, n. 6301, p. 777–783, 19 ago. 2016.
169. RASCOL; BROOKS; KORCZYN. **A FIVE-YEAR STUDY OF THE INCIDENCE OF DYSKINESIA IN PATIENTS WITH EARLY PARKINSON'S DISEASE WHO WERE TREATED WITH ROPINIROLE OR LEVODOPA**. [s.l: s.n.].
170. ROCK, F. L. *et al.*, **A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll**. [s.l.] Cold Spring Harbor Lab. Press, 1998.
171. SANTINI, E. *et al.*, Critical involvement of cAMP/DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-

- induced dyskinesia. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 26, p. 6995–7005, 27 jun. 2007.
172. SARKAR, S. *et al.*, Levodopa-induced Dyskinesia in Parkinson's Disease: Plausible Inflammatory and Oxidative Stress Biomarkers. **Canadian Journal of Neurological Sciences**, p. 1–6, 2023.
173. SCHAPANSKY, J. *et al.*, Membrane recruitment of endogenous LRRK2 precedes its potent regulation of autophagy. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 16, p. 4201–4214, 15 ago. 2014.
174. SCHAPIRA, A. H. V. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1261–1266, jul. 2007.
175. SCHAPIRA, Anthony HV. Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 1, p. 97–109, 2008.
176. SCHAPIRA, Anthony H.; JENNER, Peter. Etiology and pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement disorders**, v. 26, n. 6, p. 1049–1055, 2011.
177. SCHNEIDER, D. S. *et al.*, **Dominant and recessive mutations define functional domains of Toll, a transmembrane protein required for dorsal-ventral polarity in the *Drosophila embryo***. [s.l: s.n.].
178. SGAMBATO-FAURE, V.; CENCI, M. A. **Glutamatergic mechanisms in the dyskinesias induced by pharmacological dopamine replacement and deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease**. **Progress in Neurobiology**, jan. 2012.
179. SHAFTEL, Solomon S.; GRIFFIN, W. Sue T.; O'BANION, M. Kerry. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. **Journal of neuroinflammation**, v. 5, p. 1–12, 2008.
180. SHIM, J. H. *et al.*, TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. **Genes and Development**, v. 19, n. 22, p. 2668–2681, 15 nov. 2005.
181. SOTO-OTERO, R. *et al.*, Autoxidation and Neurotoxicity of 6-Hydroxydopamine in the Presence of Some Antioxidants. **Journal of Neurochemistry**, v. 74, n. 4, p. 1605–1612, 1 abr. 2000.
182. STEFANOVA, N. *et al.*, Toll-like receptor 4 promotes α -synuclein clearance and survival of nigral dopaminergic neurons. **American Journal of Pathology**, v. 179, n. 2, p. 954–963, ago. 2011.
183. SU, L. J. *et al.*, **Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis**. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**Hindawi Limited, , 2019.
184. SULZER, D.; ZECCA, L. **Intraneuronal Dopamine-Quinone Synthesis: A Review****Neurotoxicity Research**. [s.l: s.n.].
185. SURMEIER, D. J. *et al.*, **The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease**. **Neuroscience**, 15 dez. 2011.
186. SUZUKI, N.; SUZUKI, S.; YEH, W.-C. IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. **Trends in Immunology**, v. 23, n. 10, p. 503–506, 2002.
187. TAKEUCHI, O. *et al.*, **Differential Roles of TLR2 and TLR4 in Recognition of Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Cell Wall Components****Technology of Japan Science**. [s.l: s.n.].
188. TANG, S. C. *et al.*, Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid β -peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. **Experimental Neurology**, v. 213, n. 1, p. 114–121, set. 2008.
189. TANIK, S. A. *et al.*, Lewy body-like α -synuclein aggregates resist degradation and impair macroautophagy. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15194–15210, 24 maio 2013.
190. TEIVE, H. A. G. **O PAPEL DE CHARCOT NA DOENÇA DE PARKINSON****Arq Neuropsiquiatr**. [s.l: s.n.].
191. TELEANU, D. M. *et al.*, **An Overview of Oxidative Stress, Neuroinflammation and Neurodegenerative Diseases**. **International Journal of Molecular Sciences**MDPI, , 1 jun. 2022.
192. TOLOSA, E. S. *et al.*, Patterns of clinical response and plasma dopa levels in Parkinson's disease. **Neurology**, v. 25, n. 2, p. 177–177, 1 fev. 1975.
193. TOLOSA, S. *et al.*, **Challenges in the diagnosis of Parkinson's disease****Lancet Neurol**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.thelancet.com/neurology>.
194. TREMBLAY, M. É.; LOWERY, R. L.; MAJEWSKA, A. K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS Biology**, v. 8, n. 11, nov. 2010.
195. TRÉTIKOFF, Constantin. Contribution a l'etude de l'Anatomie pathologique du Locus Niger de Soemmering avec quelques deduction relatives a la pathogenie des troubles du tonus musculaire et de la maladie de Parkinson. **Theses de Paris**, 1919.
196. 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** Blackwell Publishing Ltd, , 1 dez. 2019.
197. TURCANO, P. *et al.*, Levodopa-induced dyskinesia in Parkinson disease A population-based cohort study. **Neurology**, v. 91, n. 24, p. E2238–E2243, 11 dez. 2018.
198. UNGERSTEDT, U. 6-HYDROXY-DOPAMINE INDUCED DEGENERATION OF CENTRAL MONOAMINE NEURONS. **EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY**, v. 5, p. 107–110, 1968.
199. UTTARA, Bayani *et al.*, Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.
200. VAN DER VLIET, A. *et al.*, **Formation of Reactive Nitrogen Species during Peroxidase-catalyzed Oxidation of Nitrite A POTENTIAL ADDITIONAL MECHANISM OF NITRIC OXIDE-DEPENDENT TOXICITY***. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www-jbc.stanford.edu/jbc/>>.
201. VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. **CYCLOOXYGENASES 1 AND 2** *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.annualreviews.org>.
202. VEKRELLIS, K. *et al.*, **Pathological roles of α -synuclein in neurological disorders. The Lancet Neurology**, nov. 2011.
203. VOLCHENKOV, R. *et al.*, The 2011 Nobel Prize in physiology or medicine. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 75, n. 1, p. 1–4, jan. 2012.
204. WALES, P. *et al.*, Limelight on Alpha-Synuclein: Pathological and Mechanistic Implications in Neurodegeneration. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 3, n. 4, p. 415–459, 1 jan. 2013.
205. WANG, C. *et al.*, TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. **Nature**, v. 412, p. 346–351, 2001.
206. WARREN OLANOW, C. *et al.*, Factors predictive of the development of Levodopa-induced dyskinesia and wearing-off in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 8, p. 1064–1071, jul. 2013.
207. WASER, E.; LEWANDOWSKI, M. **Synthese des 1-3,4-Dioxy-phenylalanins**. [s.l: s.n.].
208. WINSLOW, A. R. *et al.*, α -Synuclein impairs macroautophagy: Implications for Parkinson's disease. **Journal of Cell Biology**, v. 190, n. 6, p. 1023–1037, 20 set. 2010.
209. WOOFF, J. *et al.*, The TRAF6 RING finger domain mediates physical interaction with Ubc13. **FEBS Letters**, v. 566, n. 1–3, p. 229–233, 21 maio 2004.
210. WU, D.-C. *et al.*, **NADPH oxidase mediates oxidative stress in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of Parkinson's disease**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.093723910>.
211. XILOURI, M. *et al.*, Abberant α -synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 13 maio 2009.
212. XILOURI, M.; BREKK, O. R.; STEFANIS, L. **α -Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. Molecular neurobiology**, 2013.
213. YAHR, M. D. *et al.*, Treatment of Parkinsonism With Levodopa. **Archives of Neurology**, v. 21, n. 4, p. 343–354, 1 out. 1969.
214. YANG, K. *et al.*, **Circuit Mechanisms of L-DOPA-Induced Dyskinesia (LID). Frontiers in Neuroscience** Frontiers Media S.A., , 10 mar. 2021.
215. ZAPPALÀ, M. *et al.*, Sex Differences in Clinical and Genetic Determinants of Levodopa Peak-Dose Dyskinesias in Parkinson Disease - An Exploratory Study. **ARCH NEUROL**, v. 62, p. 601–605, 2005.
216. ZECCA, L. *et al.*, Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: Implications for Parkinson's disease. **Acta Neuropathologica**, v. 116, n. 1, p. 47–55, 15 jul. 2008.
217. ZUCCA, F. A. *et al.*, **Interactions of iron, dopamine and neuromelanin pathways in brain aging and Parkinson's disease. Progress in Neurobiology** Elsevier Ltd, , 1 ago. 2017.

9. APÊNDICE

1. CONFIRMAÇÃO DA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA COM LPS – GRUPO 2

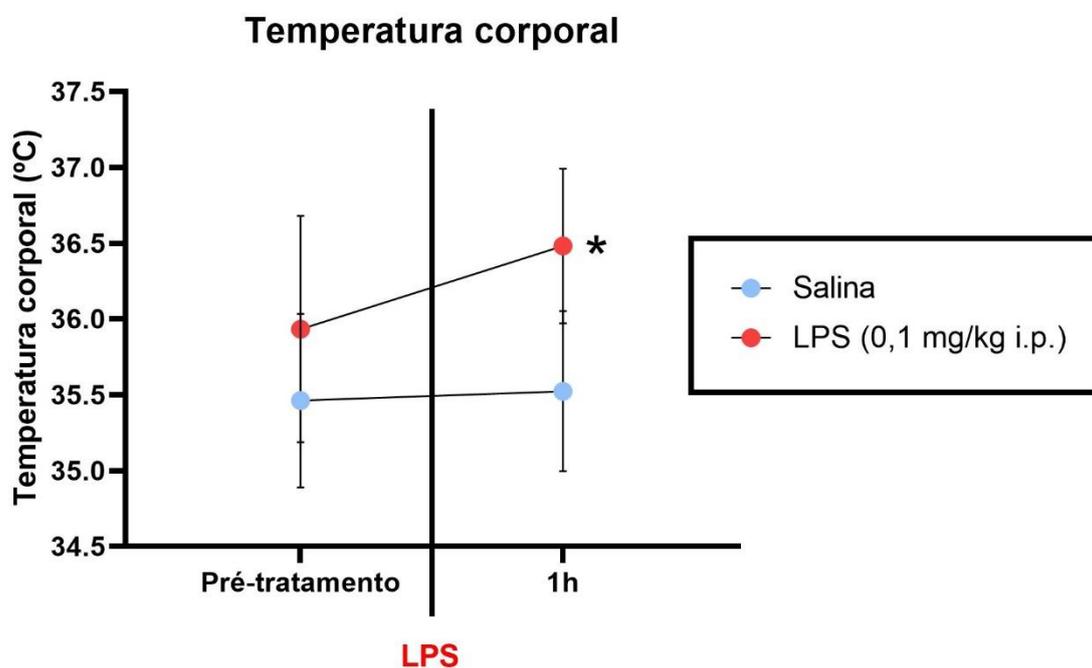
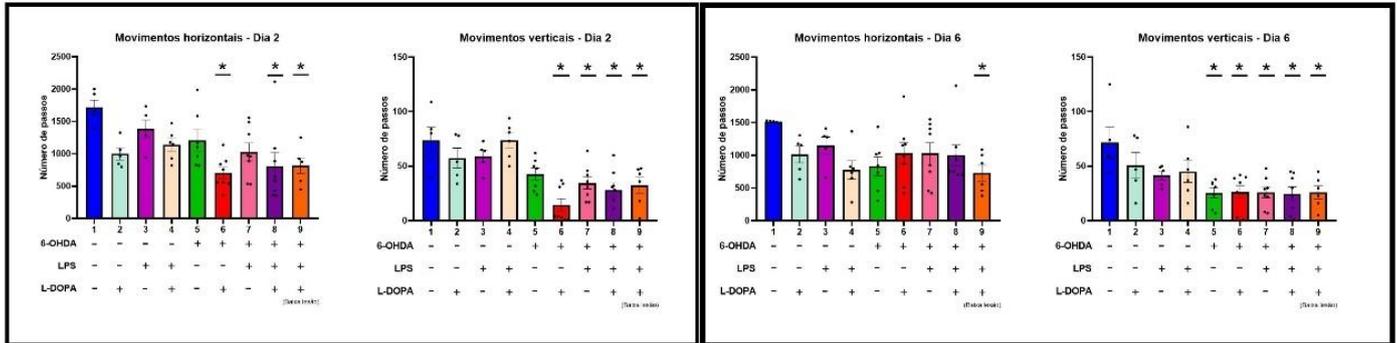


Figura suplementar 1: Avaliação da temperatura corporal (Grupo 2). Os camundongos sham e lesionados com 6-OHDA foram avaliados em sua temperatura corporal antes da administração do LPS e uma hora após a administração. Os grupos foram agrupados conforme a administração do LPS em dois grandes grupos. Houveram variações na temperatura corporal dos grupos inoculados com LPS com uma variação significativa da sua temperatura corporal em relação a temperatura basal (com $p < 0,0001$). ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni.

2. AVALIAÇÃO DA LOCOMOÇÃO NO ACTÍMETRO – GRUPO 2

Dia 2

Dia 6



Dia 11

Dia 16

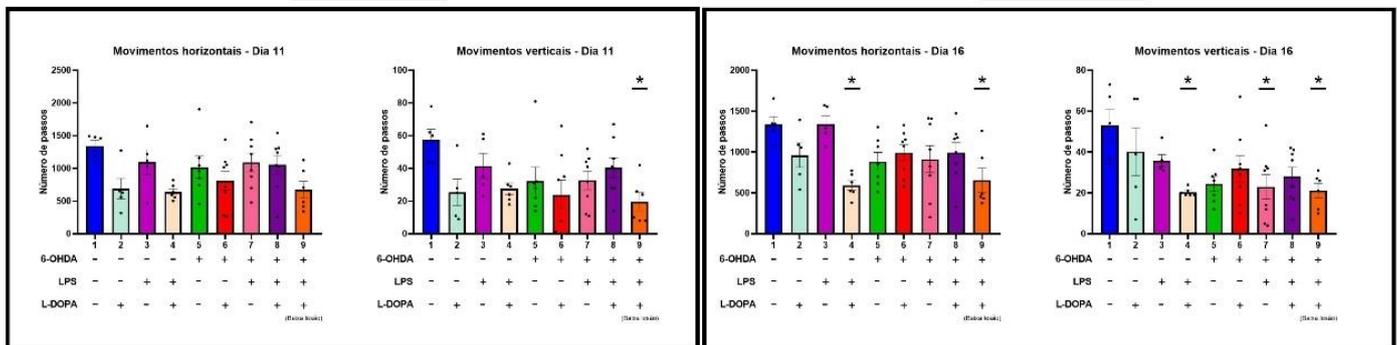


Figura suplementar 2: Avaliação locomotora dos camundongos ao longo da administração crônica com L-DOPA (Grupo 2). Esta figura apresenta um panorama geral das variações da locomoção dos grupos de experimentação. Nos dois primeiros dias de avaliação (dia 2 e dia 6) os grupos lesionados com 6-OHDA apresentaram uma queda da locomoção em relação ao grupo Sham (1). ANOVA de uma via, seguido por Bonferroni, com $*p < 0,05$.