



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

ANALU ARAGÃO FONTELES

**O *BRILLIANT BLUE G*, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, DIMINUI A
DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**

FORTALEZA

2017

ANALU ARAGÃO FONTELES

**O *BRILLIANT BLUE G*, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, DIMINUI A
DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade.

**FORTALEZA
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F762b Fonteles, Analu Aragão.

O BRILLIANT BLUE G, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, DIMINUI A DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON. / Analu Aragão Fonteles. – 2017.

116 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.

Orientação: Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade.

1. Doença de Parkinson. 2. 6-hidroxidopamina. 3. Discinesia. 4. L-DOPA. 5. Brilliant Blue G. I. Título.
CDD 615.1

ANALU ARAGÃO FONTELES

**O *BRILLIANT BLUE G*, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, DIMINUI A
DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO
EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.
Área de concentração: Farmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Raquel Carvalho Montenegro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof Dr. Reinaldo Naoto Takahashi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a. Dr^a. Claudia Ferreira Santos
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof^a. Dr^a. Carolina Melo de Souza
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

À Deus.

À Sissi, companheira inseparável e eterna.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, pois sem ele nada seria possível e nas horas mais difíceis é a ele a quem nós recorremos.

À minha família, nas pessoas de Gvargas, meu pai, Rosilene, minha mãe, e aos meus irmãos Débora e David, agradeço por estarem sempre ao meu lado e entenderem e aceitarem minhas escolhas.

Agradeço especialmente ao meu esposo, João Felipe, que sempre me deu força para nunca desistir, sempre me encorajou e me apoiou quando mais precisei.

À professora Dr^a. Geanne Matos de Andrade, pela excelente orientação e por seus ensinamentos.

Agradeço especialmente às minhas amigas e companheiras de estrada Julliana Catharina, Juliana Fernandes, Ana Paula, Carol, Patrícia, Ana Thais, Mara, Kelly Rose por estarem sempre comigo, me ajudarem e me aguentarem por todo esse tempo. Sem vocês esse trabalho não teria sido concebido.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurociências e Comportamento pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Obrigada a todos por me ajudarem a transpor mais uma etapa.

“Se você encontra um caminho sem obstáculos,
ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank Clark

RESUMO

O BRILLIANT BLUE G, ANTAGONISTA DO RECEPTOR P2X7, DIMINUI A DISCINESIA INDUZIDA POR L-DOPA EM ANIMAIS SUBMETIDOS A MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON.

A discinesia é o principal efeito adverso do tratamento crônico com L-DOPA em pacientes com Doença de Parkinson. É clinicamente caracterizada por picos de movimentos involuntários anormais coincidentes com o pico de ação da L-DOPA. Visto que o ATP participa no controle da liberação de dopamina no corpo estriado através da ativação de seus receptores, o objetivo deste trabalho foi estudar o possível efeito anti-discinético do antagonista do receptor P2X7, o *Brilliant Blue G*, na fisiopatologia da discinesia. Foram utilizados 106 ratos, *Wistar*, machos (250-300 g), divididos em sete grupos: 1. falso-operado, 2. falso-operado tratado BBG (45 mg/kg i.p.), 3. falso-operado tratado com L-DOPA (30 mg/kg v.o.), 4. animais que receberam a 6-OHDA, denominados de parkinsonianos, 5. parkinsonianos tratados com L-DOPA (30 mg/kg v.o.), 6. parkinsonianos tratados com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e BBG (22,5 mg/kg i.p.) e 7. parkinsonianos tratados com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e BBG (45 mg/kg i.p.). O modelo experimental foi induzido pela injeção de 6-OHDA no corpo estriado dos animais através de cirurgia estereotáxica. Os tratamentos com L-DOPA e BBG iniciaram-se no 15º dia após a cirurgia e foram realizados durante 22 dias. A L-DOPA foi administrada diariamente e o BBG a cada 48 h. A avaliação dos movimentos involuntários anormais (AIMs) foi realizada nos dias 21, 28 e 35 após a cirurgia e a coordenação motora no 36º dia. A degeneração neuronal foi avaliada através da imunomarcagem para tirosina hidroxilase e pela coloração por fluoro-jade C. Avaliou-se alterações no transportador de dopamina, em receptores dopaminérgicos (D1 e D2) e na proteína DARPP-32. O BBG diminuiu os AIMs nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e melhorou o desempenho de coordenação motora dos animais. A L-DOPA induziu diminuição da imunomarcagem para DAT, e da expressão de receptor D1 e de DARPP-32 fosforilada e o BBG reverteu essas alterações. A participação da neuroinflamação também foi avaliada (astrogliose, microgliose, COX-2 e IL-1 β). O tratamento com L-DOPA aumentou a neuroinflamação e o foi capaz de BBG diminuir a neuroinflamação. Nossos resultados sugerem que o sistema purinérgico desempenha importante papel no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA, e que o BBG possui efeito anti-discinético, possivelmente devido à diminuição da ativação do receptor D1 e da diminuição da neuroinflamação.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. 6-hidroxidopamina. Discinesia. L-DOPA. Brilliant blue G.

ABSTRACT

BRILLIANT BLUE G, P2X7 RECEPTOR ANTAGONIST, DIMINISHED L-DOPA-INDUCED DYSKINESIA IN ANIMALS SUBJECTED TO EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE.

Dyskinesia is a serious motor complication associated with the prolonged administration of L-DOPA in patients with Parkinson's disease. The peak of L-DOPA-induced dyskinesia (LID) greatly coincides with the maximum action of L-DOPA following its administration. Accumulating evidence supports the fact that ATP controls dopamine release in striatum through P2X7 receptor. The aim of this work was to investigate a high affinity P2X7 receptor antagonist (Brilliant Blue G) in ameliorating L-DOPA-induced dyskinesia. We selected an established 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. One hundred and six animals were divided into 7 groups as following: 1. sham-operated, 2. sham-operated treated with BBG (45 mg/kg i.p.), 3. sham-operated treated with L-DOPA (30 mg/kg), 4. exposed to 6-OHDA only, 5. exposed to 6-OHDA and treated with L-DOPA, 6. exposed to 6-OHDA and treated with L-DOPA and BBG at 22,5 mg/kg, 7. exposed to 6-OHDA and treated with L-DOPA and BBG at 45 mg/kg. Treatments were initiated 15 days following 6-OHDA exposure. L-DOPA treatment was performed daily over a period of 22 days, whereas BBG treatment was performed every other day for the same amount of time. BBG treatment significantly improved AIMs scores at 7, 14 and 21 days following L-DOPA treatment and enhanced the motor coordination performance on rotarod test. Neurodegeneration was assessed through TH-immunohistochemistry and fluoro-jade C staining though BBG did not show neuroregeneration activity and no changes were observed in fluoro-jade C staining. We also evaluated changes in DAT levels, D1 and D2 dopaminergic receptors and DARPP-32 protein and noticed that P2X7 inhibition reestablished DAT levels that were initially reduced in L-DOPA-treated animals, and ameliorated D1 receptor and pDARPP-32Thr34 expression in L-DOPA-treated animals. The neuroinflammation was evaluated through the measurement of GFAP/CD11b/COX-2-immunohistochemistry and IL-1 β expression with L-DOPA chronic therapy significantly increasing neuroinflammation in 6-OHDA treated animals, and conversely P2X7 receptor blockade diminishing it. Our results suggest that the purinergic system plays an important role in the pathophysiology of LID, with BBG showing a remarkable anti-dyskinetic effect probably by downregulating D1 pathway activation and controlling neuroinflammation.

Keywords: Parkinson's disease. 6-hydroxydopamine. Dyskinesia. L-DOPA. Brilliant Blue G.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Os tratamentos atuais da DP.....	19
Figura 2 – Rotas da dopamina (DA) no sistema dopaminérgico intacto e lesionado na DP.....	24
Figura 3 - Desenho esquemático representativo da organização clássica dos circuitos dos núcleos da base no cérebro normal, de indivíduos com DP e discinesia...	25
Figura 4 - Desenho esquemático de um terminal cortioestriatal na DP.....	27
Figura 5 - Estrutura molecular do BBG.....	34
Figura 6 - Desenho experimental.....	39
Figura 7 - Subtipos de AIMs.....	41
Figura 8 - Aparelho de Rotarod.....	42
Figura 9 - Número de rotações induzidas pela apomorfina em ratos parkinsonianos.....	47
Figura 10- Inibição do desenvolvimento de ALO AIMs pelo BBG após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	50
Figura 11- Inibição do desenvolvimento de AIMs locomotores pelo BBG após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	53
Figura 12- Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre os AIMs totais (ALO e locomotores) após a administração de uma dose de L-DOPA (30 mg/kg) no 7º, 14º e 21º dia após o início do tratamento.....	55
Figura 13- Desempenho de coordenação motora de animais hemi-parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	57
Figura 14- Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcagem para TH no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	59
Figura 15- Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcagem para TH no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	60
Figura 16- Imunomarcagem para TH no corpo estriado e mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e do BBG em animais parkinsonianos.....	61
Figura 17- Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluoro-jade C no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	63
Figura 18- Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluoro-jade C no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	64
Figura 19- Coloração por fluoro-jade C no corpo estriado e mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e BBG em animais parkinsonianos.....	65
Figura 20- Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcagem para DAT no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	67
Figura 21- Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcagem para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	68
Figura 22- Imunomarcagem para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e BBG em animais parkinsonianos.....	69

Figura 23-	Expressão do receptor D1 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	70
Figura 24-	Expressão do receptor D2 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	71
Figura 25-	Expressão da proteína pDARPP-32Thr34 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	73
Figura 26-	Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	75
Figura 27-	Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.....	76
Figura 28-	Imunofluorescência para CD11b no corpo estriado e mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e BBG em animais parkinsonianos.....	77
Figura 29-	Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcção por GFAP no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	79
Figura 30-	Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcção por GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	80
Figura 31-	Imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	81
Figura 32-	Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcção para COX-2 no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	83
Figura 33-	Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcção para COX-2 no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.....	84
Figura 34-	Número de células COX-2 positivas no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	85
Figura 35-	Expressão de IL-1 β no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	86
Figura 36-	Modelo proposto para o envolvimento do receptor de purinas, P2X7, na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA em animais parkinsonianos.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos e tratamentos.....	46
Tabela 2 - Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA.....	47
Tabela 3 - Escores de ALO AIMs dos grupos FO, FO+BBG 45 e FO+L-DOPA avaliados nos dias 7, 14 e 21 após a administração de L-DOPA.....	49
Tabela 4 - Escores de AIMs locomotores dos grupos FO, FO+BBG 45 e FO+L-DOPA avaliados nos dias 7, 14 e 21 após a administração de L-DOPA.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5HT-1	Receptor de serotonina tipo 1
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AIMs	Movimentos involuntários anormais
ALO AIMs	Movimentos involuntários anormais axiais, de membro e orolinguais
AMPc	Adenosine monofosfatocíclica
ATP	Adenosina trifosfato
BBG	<i>Brilliant Blue G</i>
COMT	Catecol-O-metil transferase
COX-2	Ciclooxigenase2
CREB	proteína de ligação ao elemento responsivo ao AMPc
D1	Receptor dopaminérgico tipo 1
D2	Receptor dopaminérgico tipo 2
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DARPP-32	fosfoproteína neuronal regulada por dopamina e AMPc
DAT	transportador de dopamina
DOPAC	3,4-diidroxifenilacético
DP	Doença de Parkinson
EPM	Erro padrão da média
ERK	proteínas quinase regulada por sinalização extracelular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GPe	Globo pálido externo
GPi	Globo pálido interno
HVA	Ácido homovalínico
IL-1 β	Interleucina 1 beta
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IP3	inositoltri-fosfato
L-DOPA	3,4-dihidroxi-L-fenilalanina
MAO-B	Monoaminoxidase B
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

NAc	Núcleo accumbens
PBS	Salina + Tampão fosfato
PKA	Fosfoquinase A
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
STN	Núcleo subtalâmico
TH	Tirosina hidroxilase

LISTA DE SÍMBOLOS

- ® Marca Registrada
- % Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Doença de Parkinson.....	17
1.2	Tratamento da DP.....	19
1.3	Discinesia induzida por L-DOPA.....	21
1.4	Mecanismos fisiopatológicos da discinesia induzida por L-DOPA.....	22
1.5	Modelos experimentais de DP e de discinesia induzida por L-DOPA em animais.....	29
1.6	Modulação da neurotransmissão dopaminérgica pelo ATP.....	31
2	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivos gerais.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	METODOLOGIA	37
4.1	Animais.....	37
4.2	Drogas.....	37
4.3	Protocolo Experimental.....	37
4.4	Lesão intraestriatal por 6-OHDA.....	39
4.5	Teste rotacional induzido por apomorfina.....	40
4.6	Movimentos involuntários anormais.....	40
4.7	Avaliação da coordenação motora - Teste de rotarod.....	42
4.8	Análise histológica e imunohistoquímica.....	43
4.8.1	<i>Imunomarcção para TH, DAT e COX-2.....</i>	43
4.8.2	<i>Coloração com Fluoro-Jade C.....</i>	44
4.8.3	<i>Imunofluorescência para GFAP, CD11-b.....</i>	44
4.9	Western-blot.....	45
4.10	Análise estatística.....	46
5	RESULTADOS.....	47
5.1	Avaliação da rotação induzida pela apomorfina para seleção dos animais parkinsonianos.....	47

5.2	Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre o desenvolvimento de ALO AIMs após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	48
5.3	Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre o desenvolvimento de AIMs locomotores após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.....	51
5.4	Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre o desenvolvimento de AIMs no 7º, 14º e 21º dia após o início da administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos: curva de tempo após uma dose de L- DOPA.....	54
5.5	Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre a coordenação motora de ratos parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg).....	57
5.6	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a morte neuronal avaliada através da imunomarcção por TH no mesencéfalo e no corpo estriado de ratos discinéticos hemi-parkinsonianos.....	58
5.7	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a degeneração neuronal avaliada através da coloração por fluoro-jade C no mesencéfalo e corpo estriado de ratos discinéticos hemi-parkinsonianos.....	62
5.8	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a imunomarcção para DAT no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.....	66
5.9	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre receptor dopaminérgico D1 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.....	70
5.10	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre receptor dopaminérgico D2 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.....	71
5.11	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre pDARPP-32Thr34 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.....	72
5.12	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre ativação de micróglia avaliada através da imunomarcção por CD11b no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.....	74

5.13	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre ativação de astrócitos avaliada através da imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.....	78
5.14	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a neuroinflamação avaliada através da imunomarcção de COX-2 no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.....	82
5.15	Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre IL-1β no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.....	86
6	DISCUSSÃO.....	87
7	CONCLUSÃO.....	101
8	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO A – DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UFC	116

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson e atualmente é a doença neurodegenerativa mais comum depois da Doença de Alzheimer, atingindo cerca de 1 % da população mundial acima de 65 anos de idade (ELBAZ *et al.*, 2015; TYSNES; STORSTEIN, 2017). Estima-se que a incidência da DP esteja entre 10 a 50 casos por 100 mil pessoas ao ano e sua prevalência entre 100 a 300 indivíduos a cada 100 mil habitantes (PRINGSHEIN *et al.*, 2014; ELBAZ *et al.*, 2015). Apesar de não possuir altas taxas de incidência e prevalência, estima-se que em 2030 o número de indivíduos com a doença suba para mais que o dobro (DORSEY *et al.*, 2007).

Dados do CENSO 2000, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e estatística (IBGE), revelam que no Brasil a prevalência da DP em pessoas com idade entre 60 e 69 anos é de 700 a cada 100 mil indivíduos, e entre 70 e 79 anos é de 1500 a cada 100 mil. Além disso, 36 mil novos casos surgem por ano no país. A DP já ultrapassa 200 mil casos, sendo a maior parte concentrada nas regiões Sudeste e Sul, responsável por um total estimado de 64 mil casos (BRASIL, 2006). Estudos sobre o perfil epidemiológico de pacientes com DP no Brasil mostram que a maioria dos pacientes é homem com idade acima de 50 anos, e que o início da doença ocorre principalmente na faixa de idade entre 50-59 anos, seguido pela faixa de idade entre 60-69 anos e 70-79 anos (PALERMO *et al.*, 2009; CORIOLANO *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2016).

A DP é caracterizada clinicamente por tremor de repouso, acinesia, rigidez e problemas posturais (WIRDEFELD *et al.*, 2011; MORIGUCHI *et al.*, 2012, TYSNES; STORSTEIN, 2017). Patologicamente caracteriza-se por uma degeneração dos neurônios dopaminérgicos da região *pars compacta* da substância negra levando à perda de dopamina no corpo estriado. Essa degeneração envolve mecanismos como a inflamação, estresse oxidativo, alterações genéticas, disfunção mitocondrial entre outros. A presença de corpúsculos de Lewy, inclusões de proteína, principalmente de α -sinucleína no citoplasma intraneural também está relacionada com o desenvolvimento da DP. Estas inclusões ocorrem principalmente no *locus ceruleus*, núcleos basais, hipotálamo, córtex cerebral, núcleos motores dos nervos cranianos e

em componentes centrais e periféricos do sistema nervoso autônomo (WIRDEFELD *et al.*, 2011; PAL *et al.*, 2011).

Os sintomas clássicos da DP manifestam-se após a perda de cerca de 70 a 80 % dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc), localizada no mesencéfalo, levando a uma severa redução nos níveis de dopamina estriatais (WIRDEFELD *et al.*, 2011; LEVY *et al.*, 2009). Além dos sintomas clássicos descritos anteriormente os pacientes apresentam outros tipos de sintomas, classificados como sintomas não-motores. Estudo realizado no Estado de Pernambuco demonstrou que os pacientes com DP do Hospital das Clínicas do Estado apresentaram sintomas como constipação intestinal, insônia, dor muscular e articular, hipotensão ortostática, impotência sexual, dentre outros (CORIOLANO *et al.*, 2013).

Existem três vias dopaminérgicas no SNC. São elas a via mesocorticolímbica, que emite projeções da área tegmental ventral do mesencéfalo para o córtex cerebral, núcleo accumbens e outras estruturas límbicas, responsável pela motivação, pensamento orientado para metas, regulação do afeto e reforço positivo, a via nigroestriatal, que envia projeções do mesencéfalo para o corpo estriado, responsável principalmente pela função motora, e a via túbero-infundibular, onde os corpos celulares de neurônios dopaminérgicos estão situados nos núcleos arqueados e paraventriculares do hipotálamo projetando axônios para a eminência do hipotálamo, responsável pelo controle da liberação de prolactina (GOLAN, 2009).

A via nigroestriatal é o maior trato dopaminérgico no SNC, contendo cerca de 80 % da DA do cérebro. É a via mais afetada na DP, sendo formada por neurônios dopaminérgicos cujos corpos celulares se localizam na SNpc e projetam seus axônios para o caudado-putâmem, correspondendo ao corpo estriado (PRZEDBORSKI, 2005). No corpo estriado de pacientes com DP há uma redução dos níveis de DA e de seus metabólitos, como o ácido homovalínico (HVA) e 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC). Também se observa a redução da atividade de enzimas envolvidas na síntese de DA, como a tirosina hidroxilase (TH) e a dopa-descarboxilase (LANG; LOZANO, 1998; MIZUNO, 1999; GERLACH E RIEDERER, 1996).

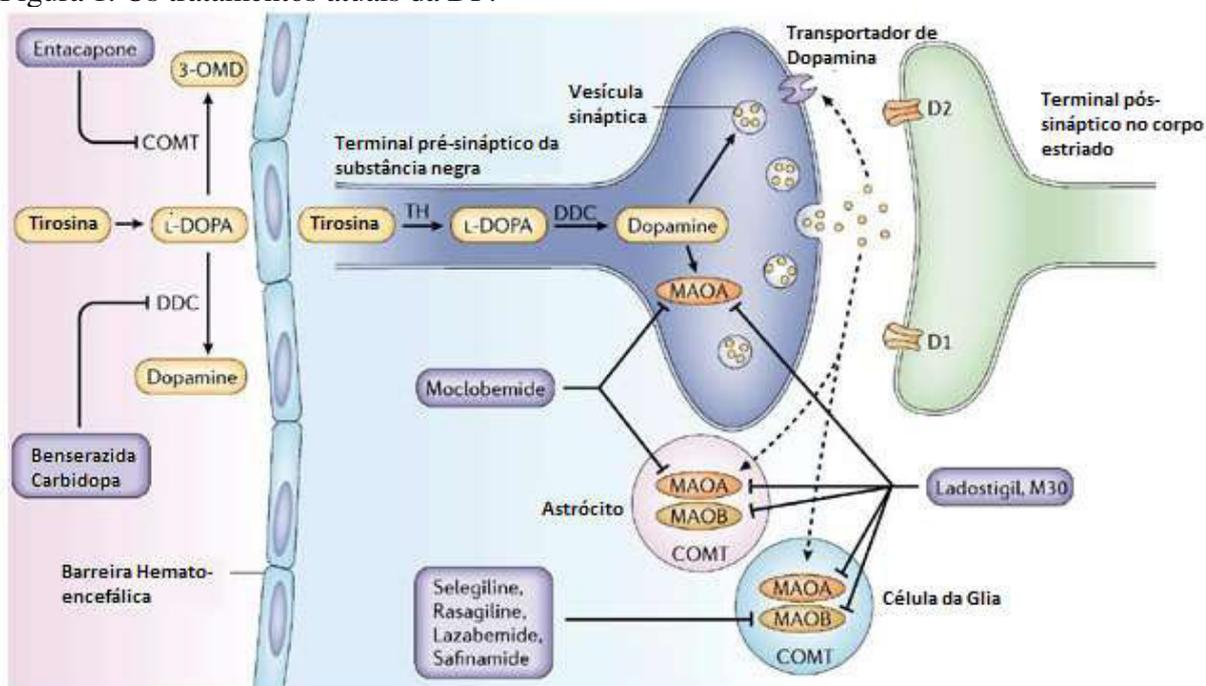
Vários fatores estão implicados na patogênese da morte celular que ocorre na DP. A origem da degeneração neuronal é desconhecida e provavelmente envolve muitos eventos celulares e moleculares, incluindo estresse oxidativo, acúmulo de proteínas alteradas,

excitotoxicidade, processo inflamatório, mecanismos pró-apoptóticos e disfunção mitocondrial (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

1.2 Tratamento da DP

As terapias atuais consistem essencialmente em três estratégias: a reposição de dopamina, a inibição de sua degradação e o uso de agonistas dopaminérgicos (Figura 1). A reposição da perda de dopamina cerebral através do uso da 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) associada a inibidores da dopa-descarboxilase periférica, como a carbidopa e a benserazida, é o tratamento de primeira escolha (HUOT *et al.*, 2013).

Figura 1. Os tratamentos atuais da DP.



Adaptado de Youdim *et al.* (2006).

O tratamento de reposição de dopamina por L-DOPA foi introduzido em meados dos anos 60, inicialmente sem o uso de inibidores da dopa-descarboxilase periférica, utilizando-se doses bem maiores que as praticadas atualmente. Os inibidores da dopa-descarboxilase periférica foram introduzidos na terapia na segunda metade dos anos 60, permitindo a redução das doses de L-DOPA, diminuindo assim complicações relacionadas à sua metabolização periférica, dentre estes, os problemas gastrointestinais como náuseas e vômitos, e cardiovasculares como a hipotensão postural (HOUT *et al.*, 2013).

O tratamento crônico com L-DOPA não é capaz de impedir a morte neuronal ocorrida, é eficaz no controle dos sintomas motores, porém não tem eficácia contra os sintomas não-motores. Apesar disso, a terapia com L-DOPA ainda é a principal forma de tratamento da DP (BIDO, MARTI, MORARI *et al.*, 2011, DHALL; KREITZMAN, 2016). Embora a associação aos inibidores da dopa-descarboxilase periférica tenha diminuído os efeitos relacionados à metabolização periférica da L-DOPA, os efeitos relacionados à sua ação no SNC ainda não foram solucionados, causando sintomas incapacitantes não responsivos ao tratamento (EMBORG *et al.*, 2004).

Os efeitos adversos relacionados ao aumento de dopamina no SNC podem variar desde flutuações clínicas até discinesia, o que muitas vezes leva à redução da medicação, ou até mesmo a interrupção do tratamento (LEENTJENS, 2011; FABBRINI *et al.*, 2007; CHAPUIS *et al.*, 2005).

A terapia de L-DOPA enfrenta vários desafios resultantes das interações complexas entre a farmacocinética da própria L-DOPA e as alterações neuronais progressivas induzidas pela neurodegeneração na DP. A L-DOPA é metabolizada em dopamina já na periferia permitindo que apenas 30 % da dose administrada cheguem à circulação. O uso dos inibidores da dopa-descarboxilase periférica melhora a biodisponibilidade da L-DOPA, reduzindo a dose terapêutica administrada. No início do tratamento com L-DOPA o efeito terapêutico de cada dose pode durar em média de 8 a 12 horas após a administração, apesar da meia-vida ser de apenas 4 horas (BASTIDE *et al.*, 2015).

Flutuações clínicas são caracterizadas por encurtamento ou inconsistência do efeito da L-DOPA. Cerca de 80 % dos pacientes apresentam este tipo de complicação após 5 anos de tratamento. As flutuações clínicas mais comuns são o fenômeno de “wearing-off”, que representa o encurtamento da resposta, o fenômeno de “on-off”, onde o paciente flutua entre os estados “on”, no qual ocorre a ação da L-DOPA, e estado “off”, onde a L-DOPA para de ter ação. Outra forma de flutuação bastante comum é o fenômeno de “freezing”. Este fenômeno corresponde a incapacidade momentânea de iniciar ou de executar um movimento que pode comprometer a locomoção, a fala e a movimentos das mãos (RINGENDAHL; SIERLA, 1997; JENNER, 2013; LEWITT; FAHN, 2016).

Muitos estudos clínicos pesquisam novas estratégias que possuam a mesma eficácia no controle dos sintomas motores e que não causem tantos efeitos adversos, porém sem sucesso.

Formulações alternativas de L-DOPA aparecem como as mais promissoras alternativas, especialmente para melhorar as flutuações motoras, seja promovendo efeitos benéficos através de formulações de liberação controlada ou ainda através de melhor controle das complicações motoras do tipo “off”, através do uso de L-DOPA inalatória (LEWITT; FAHN, 2016; LOTIA, JANKOVIC *et al.*, 2016; DHALL; KREITZMAN, 2016). Estudo experimental demonstrou que nanopartículas de metilester-levodopa associada à benserazida diminuiu os movimentos involuntários anormais de ratos hemi-parkinsonianos (YANG, 2012), demonstrando assim que a liberação controlada de L-DOPA pode diminuir a incidência da discinesia.

Além da L-DOPA outras drogas são prescritas atualmente no tratamento da DP, como agonistas dos receptores de DA (ex. pramipexol), inibidores da MAO-B (ex. selegilina), anti-virais com influência na síntese da DA (ex. amantadina), inibidores de catecol-O-metil transferase (COMT) (ex. entacapone) e anticolinérgicos (ex. triexifenidila) (NAGATSU; SAWADA, 2009).

1.3 Discinesia induzida por L-DOPA

O tratamento com L-DOPA é bem tolerado inicialmente pela maioria dos pacientes com DP e promove uma melhora significativa na função motora (NUTT 2008; STOCCHI *et al.*, 2008). Apesar deste fato, cerca de 40 % dos pacientes tratados com L-DOPA por mais de 5 anos apresentam discinesia. Alguns estudos demonstram que mais de 56 % dos pacientes com DP apresentam discinesia antes de 2,9 anos de tratamento (BLANCHET *et al.*, 1996) e essa porcentagem sobe para 95 % após 15 anos de tratamento (HELY *et al.*, 2005). A discinesia tem um impacto negativo na qualidade de vida desses pacientes, sendo às vezes mais prejudicial do que a própria DP (PECHEVIS *et al.*, 2005; FAHN, 2000).

A discinesia induzida por L-DOPA é caracterizada por picos de movimentos involuntários que coincidem com o pico de ação da L-DOPA (ELBAZ *et al.*, 2015). Apresentam-se clinicamente como movimentos involuntários variados que afetam partes do corpo distintas, podendo tornar-se generalizados e severamente incapacitantes. Uma vez estabelecidos, os movimentos involuntários voltam a ocorrer após cada nova administração de L-DOPA (JENNER, 2008).

As discinesias enfrentadas pelos pacientes em tratamento com L-DOPA são movimentos involuntários diferentes do tremor. São agrupadas quanto a atividade de

dopamina em: discinesias do tipo “off”, quando há baixos níveis de dopamina, e discinesias do tipo “on”, onde há níveis elevados de dopamina. Sob o ponto de vista fenomenológico as discinesias do tipo “off” são distonias dolorosas, na forma de um movimento anormal caracterizado por contrações musculares anormais padronizadas, que produzem movimentos de torção ou posturas anormais. Este tipo de discinesia ocorre geralmente à noite ou ao acordar. A discinesia do tipo “on” compreende usualmente em coréia, distonia e estereotipia. Este tipo de discinesia é ainda subdividido no grupo em que a manifestação mais comum é a coréia, relacionada com o pico de dose de L-DOPA, e em um segundo subgrupo onde há ocorrência maior de distonia e estereotipia, associada ao decaimento dos níveis plasmáticos da droga, chamada discinesia bifásica (JENNER, 2013). A coréia é caracterizada como um movimento involuntário, irregular, sem propósito, não ritmado, abrupto e rápido que parece sair de uma região para outra do corpo. A distonia é a segunda forma mais comum de discinesia e é caracterizada pela contração sustentada de músculos agonistas ou antagonistas podendo envolver grupos de músculos secundários (BASTIDE *et al.*, 2015).

1.4 Mecanismos fisiopatológicos da discinesia induzida por L-DOPA

Os mecanismos pelos quais a L-DOPA causa a discinesia ainda não foram totalmente esclarecidos, por isso a necessidade de se investigar os fatores envolvidos na patogênese deste fenômeno. Muito embora, existam diversos mecanismos bioquímicos e moleculares relacionados ao desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA, mudanças no circuito dos núcleos da base são o principal fator (JIMÉNEZ-URBIETA *et al.*, 2015). Evidências sugerem que a perda de neurônios dopaminérgicos na substância negra cria alterações na interação entre corpo estriado e o córtex motor, estabelecendo uma perturbação da função dos núcleos da base que pode levar à geração de movimentos involuntários. Assim, a degeneração dos neurônios da substância negra é responsável pela alteração na função dos núcleos da base que leva a discinesia. A extensão dessa degeneração regula o nível e a duração da exposição a L-DOPA necessária para induzir a discinesia (JENNER, 2008).

Alguns autores sugerem que a degeneração de neurônios no corpo estriado sem exposição a L-DOPA também seja um fator importante para o desenvolvimento da discinesia, apesar de estudos mostrarem que macacos lesionados com MPTP e ratos lesionados com 6-OHDA no corpo estriado sem o tratamento com L-DOPA nunca desenvolveram discinesia, mostrando que a extensão da lesão é importante, porém outros fatores também estão envolvidos (HOUT *et al.*, 2013). Entretanto, estudos realizados com animais não

parkinsonianos demonstraram desenvolvimento de discinesia após a administração de altas doses de L-DOPA/benserazida, tornando inconclusiva a teoria da participação da degeneração dos neurônios estriatais com o desenvolvimento da discinesia (HUOT, 2015).

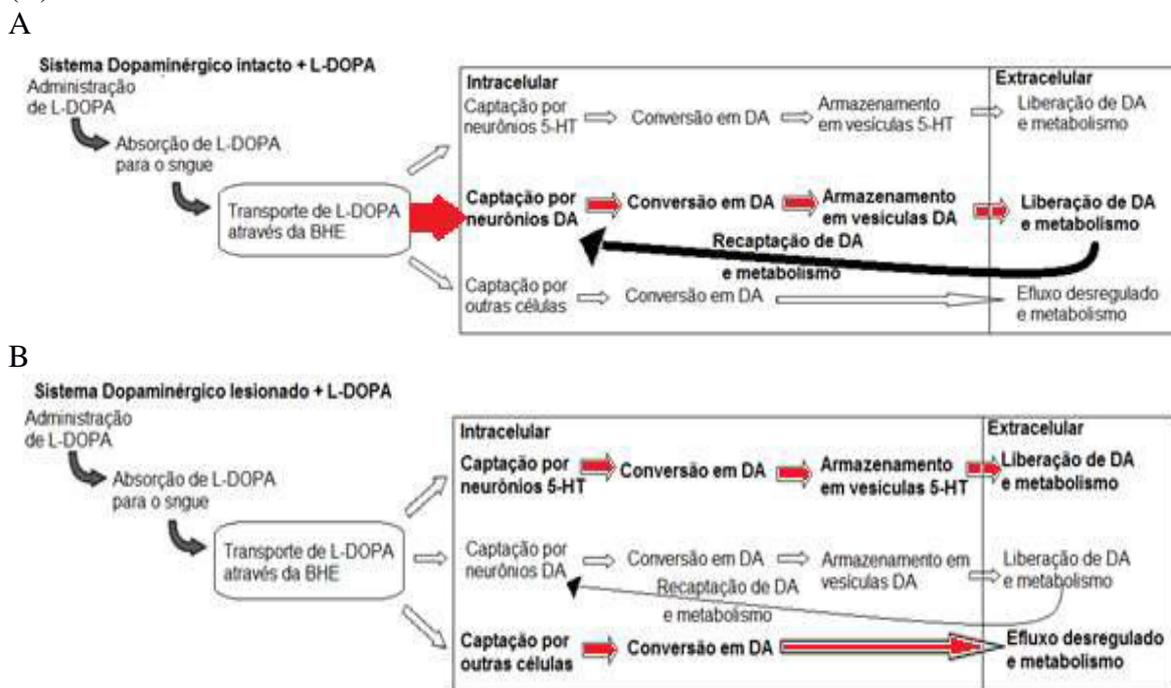
Os mecanismos centrais de discinesia incluem a progressão da degeneração nigroestriatal, resultando na redução da capacidade de estocar a dopamina nas vesículas pré-sinápticas e liberá-la fisiologicamente, o aumento da conversão de L-DOPA em dopamina e a liberação aberrante de outros neurotransmissores pelos neurônios serotoninérgicos, alterações de receptores dopaminérgicos, que levam a mudanças sinápticas, incluindo a hipersensibilidade à dopamina devido à perda de projeções nigroestriatais, dessensibilização e diminuição dos receptores da superfície celular por causa da presença não fisiológica de altas doses de dopamina e o aumento da atividade glutamatérgica no corpo estriado (MAGRINELLI *et al.*, 2016).

Sabe-se que no início do tratamento, após a administração de L-DOPA, a dopamina produzida é armazenada em vesículas pelos neurônios dopaminérgicos sobreviventes que a liberam ao longo de várias horas, permitindo um prolongamento da resposta terapêutica. À medida que a progressão da doença ocorre, há redução da capacidade de armazenamento de dopamina. Consequentemente há progressiva tendência de ocorrer sobreposição de curvas de níveis plasmáticos, bem como de resposta à L-DOPA. Além disso, a meia-vida curta da L-DOPA juntamente com o aumento da frequência das doses ao longo do tratamento causa liberação intermitente e pulsada de dopamina no corpo estriado, levando às alterações pós-sinápticas de receptores (DHALL; KREITZMAN, 2016).

O armazenamento e liberação de DA no cérebro do indivíduo com DP estão alterados (Figura 2). No sistema dopaminérgico intacto, a L-DOPA é captada principalmente por neurônios dopaminérgicos, onde é convertida em DA. A DA é então armazenada em vesículas através do transportador vesicular de monoaminas (VMAT) e liberada em resposta a um estímulo na fenda sináptica. O transportador de dopamina (DAT) tem a função de remover a DA remanescente na fenda, mecanismo eficiente de recaptção de DA na membrana pré-sináptica de neurônios dopaminérgicos. À medida que a DP progride, a L-DOPA é captada não só por neurônios dopaminérgicos remanescentes, mas por outros neurônios que são capazes de converter a L-DOPA em DA, principalmente neurônios serotoninérgicos do núcleo da rafe, além de outras células, contribuindo assim para a liberação intermitente da DA no corpo estriado (CENCI; LUNDBLAD, 2006). A importância dessa rota

da DA em modelos animais de lesão por 6-OHDA é ainda mais pronunciada (MAEDA *et al.*, 2005).

Figura 2. Rotas da dopamina (DA) no sistema dopaminérgico intacto (A) e lesionado na DP (B).

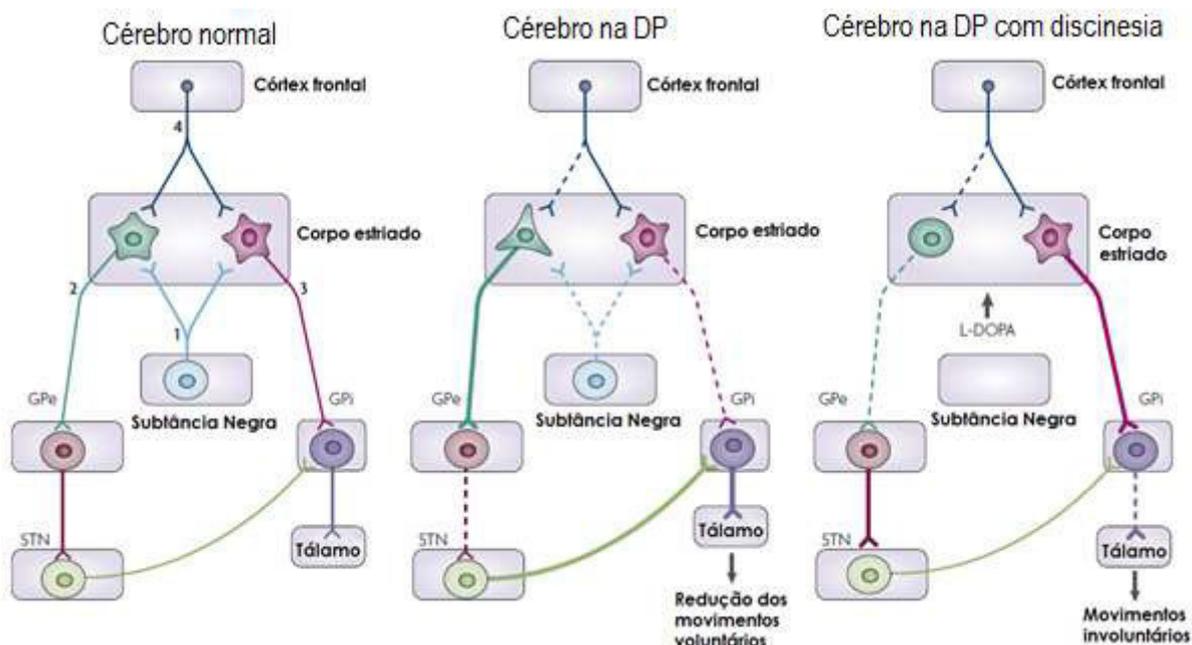


Adaptado de CENCI; LUNDBLAD, 2006.

Os núcleos da base são formados pela substância negra, corpo estriado (regiões caudato e putâmem), segmentos interno (GPi) e externo (GPe) do globo pálido e núcleo subtalâmico (STN) (Figura 3). De acordo com a organização clássica dos núcleos da base, o córtex cerebral envia projeções excitatórias glutamatérgicas para o corpo estriado. Essa via é modulada por projeções advindas da substância negra *pars compacta*, chamada de via nigroestriatal. Esta via lança dopamina no corpo estriado, podendo ser excitatória, relacionada aos receptores D1, através da via direta, ou ainda inibitória, relacionada aos receptores D2, através da via indireta. A via direta consiste em projeções gabaérgicas, advindas do corpo estriado, em direção ao GPi e substância negra *pars reticulada*, que também emitem fibras gabaérgicas às regiões ventrolateral e ventroanterior do tálamo. Na via indireta neurônios estriatais lançam projeções gabaérgicas para o GPe, que por sua vez, lança projeções gabaérgicas para o STN. O STN, então, envia projeções glutamatérgicas para o GPi e para a substância negra *pars reticulada* fechando assim o circuito (JENNER, 2008; HOUT *et al.*, 2013; MAGRINELLI *et al.*, 2016).

No modelo clássico da fisiopatologia da DP ocorre uma perda da projeção dopaminérgica advinda da substância negra levando a uma hiperatividade da via indireta e diminuição da atividade da via direta, assim como as projeções advindas do córtex para o corpo estriado também estão alteradas (Figura 3) (JENNER, 2008; 2013).

Figura 3. Desenho esquemático representativo da organização clássica dos circuitos dos núcleos da base no cérebro normal, de indivíduos com DP e discinesia.



Conexões no cérebro normal: (1) Projeções dopaminérgicas oriundas da substância negra no mesencéfalo para o corpo estriado. (2) Projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o GPe através da via indireta. (3) projeções gabaérgicas inibitórias do corpo estriado para o GPi através da via direta. (4) Projeções glutamatérgicas excitatórias advindas do córtex frontal. Adaptado de JENNER, 2008.

Em circunstâncias fisiológicas normais a DA é liberada pelos neurônios da via nigroestriatal estimulando os receptores D1 pela via direta e os receptores D2 pela via indireta. A ativação de receptores D1 e D2 tem efeitos opostos, visto que os receptores D1 estão acoplados a proteína $G\alpha_s$ que ativa adenilil ciclase levando a aumento de AMPc, enquanto que os receptores D2 estão acoplados à proteína $G\alpha_i$, que inibe a adenilil ciclase reduzindo AMPc citoplasmático (STOOF; KEBABIAN, 1981; ZHUANG *et al.*, 2000; CORVOL *et al.*, 2001). O AMPc regula a fosfoquinase A (PKA) que inicia a expressão de genes através de uma cascata de ativação de proteínas que culminam com a ativação de fatores de transcrições como CREB e então a expressão de genes. Quando os receptores D1 e D2 são co-estimulados ocorre à dissociação do receptor D1 da proteína $G\alpha_s$, se ligando então a proteína $G\alpha_q$ que ativa a fosfolipase C, formado inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG), levando ao aumento de cálcio intracelular a partir do retículo endoplasmático (HEUMANN *et al.*, 2014).

Apesar de ainda não estar claro o mecanismo preciso de como a discinesia induzida por L-DOPA se desenvolve, sabe-se que modulações pré e pós-sinápticas no corpo estriado estão envolvidas. Estudos mostram que a inativação completa de receptores D1 bloqueia o desenvolvimento de discinesia através do bloqueio da fosforilação de proteínas de sinalização extracelular reguladas por quinases (ERK), de FosB e de expressão de dinorfina. Enquanto que o receptor D2 parece apenas modular o processo (HEUMANN *et al.*, 2014). Um dos mecanismos pós-sinápticos está relacionado ao aumento de DA e glutamato no corpo estriado que levam a aumento da atividade das cascatas de sinalização. No corpo estriado normal o receptor D1, a partir do AMPc, ativa PKA que leva a fosforilação de substratos como a fosfoproteína neuronal regulada por dopamina e AMPc, a DARPP-32 (BUCK & FERGER, 2009; PICCONI *et al.*, 2003; ROBELET *et al.*, 2004; SANTINI *et al.*, 2007). Na discinesia parece haver uma superativação dessa cascata no corpo estriado com depleção de dopamina, fenômeno chamado de hipersensibilização. Evidências sugerem que esse fenômeno está ligado ao desenvolvimento de sintomas discinéticos correlacionados com o aumento da expressão de FosB em camundongos e ratos (PAVON *et al.*, 2006).

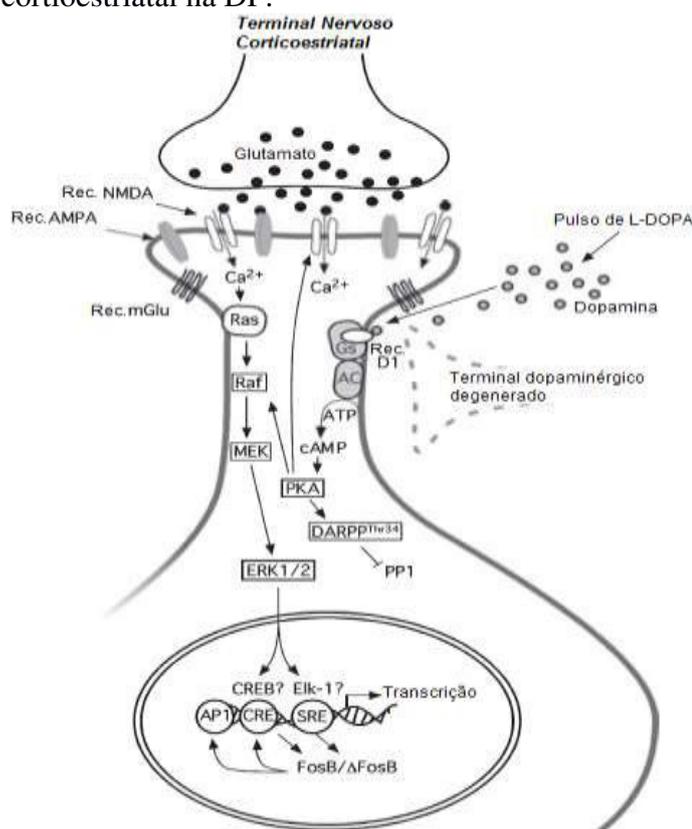
O envolvimento de fatores de transcrição como o CREB parece estar relacionado à fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA. Foi demonstrado que ratos lesionados com 6-OHDA que receberam uma injeção intraestriatal de códon antisense de CREB, que desativa o CREB, obtiveram AIMs (*abnormal involuntary movements – AIMs*) mais severos após uma administração aguda de L-DOPA (ANDERSSON *et al.*, 2001) sugerindo que o CREB esteja mais envolvido ao efeito anti-discinético. O envolvimento do transportador de dopamina (DAT) também já está bem estabelecido. Uma redução de cerca de 50 % do DAT é capaz de promover discinesia em primatas não humanos lesionados com MPTP (DI MONTE *et al.*, 2000). Estudos têm demonstrado através da análise proteômica, diversas proteínas com níveis de expressão alterados em animais submetidos à injeção unilateral de 6-OHDA. Mais de 70 proteínas apresentaram diferenças significativas em suas expressões temporal e espacial entre os grupos 6-OHDA e controles, principalmente proteínas mitocondriais (PARK *et al.*, 2010) e sinápticas (XIONG *et al.*, 2014).

Além dos mecanismos de discinesia acima citados, podemos descrever outros, como a disfunção no estoque e liberação de dopamina, alterações no tráfico intracelular de receptores glutamatérgicos, alterações na transmissão serotoninérgica, disfunção de sinalização

intracelular, alteração na atividade de canais de cálcio, alteração na expressão de genes e alteração na plasticidade neuronal (IRAVANI, JENNER, 2011).

A proximidade dos neurônios corticoestriatais e nigroestriatais permite a interação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) de glutamato a receptores dopaminérgicos D1 na membrana pós-sináptica de neurônios estriatais (Figura 4) (CENCI; LUNDBLAD, 2006).

Figura 4. Desenho esquemático de um terminal corticoestriatal na DP.



Adaptado de CENCI; LUNDBLAD, 2006.

Estudos mostram que o complexo D1/NMDA está relacionado com o desenvolvimento de discinesia após a administração de L-DOPA. Esta interação leva a especulação de que esta potencialização anormal e irreversível das sinapses corticoestriatais pode contribuir para a discinesia ao interromper a capacidade dos neurônios estriatais de discriminar entre comandos corticais relevantes e irrelevantes durante a codificação neural de sequências motoras (CENCI; LUNDBLAD, 2006; SONG *et al.*, 2016).

Projeções glutamatérgicas oriundas do córtex motor direcionadas ao corpo estriado estão alteradas nos modelos animais de DP e de discinesia induzida por L-DOPA.

Através da ativação de receptores NMDA e AMPA, o glutamato media a comunicação do córtex com os núcleos da base no circuito motor (CENCI; LUNDBLAD, 2006).

Estudos demonstram que o desenvolvimento de discinesia induzida por L-DOPA é caracterizado por alterações no receptor NMDA através da formação de um complexo com o receptor D1, do aumento da expressão da subunidade GluN2A e diminuição da expressão da subunidade GluN2B na sinapse (HALLETT *et al.*, 2005; GARDONI *et al.*, 2006). O desacoplamento do complexo D1/NMDA em ratos lesionados por 6-OHDA alivia o aparecimento de movimentos involuntários anormais nesses animais (SONG *et al.*, 2016).

Atualmente o principal tratamento clínico baseado em evidências para as discinesias se dá pelo uso da amantadina, uma droga que além de outros mecanismos é antagonista dos receptores NMDA. Inúmeros estudos clínicos têm mostrado a amantadina como droga promissora no combate as discinesias induzidas por L-DOPA (BASTIDE *et al.*, 2015). A memantina, outro antagonista de receptor NMDA, que também demonstrou efeito anti-discinético em ratos lesionados por 6-OHDA que receberam tratamento com L-DOPA (TRONCI *et al.*, 2014) também já está em fase de estudos clínicos e têm demonstrado efeito anti-discinético em humanos (WICTORIN *et al.*, 2016).

Há ainda evidências da participação do sistema serotoninérgico na fisiopatologia da discinesia, despontando o receptor 5HT-1 como estratégia promissora de neuroproteção (TRONCI *et al.*, 2013; CONTI *et al.*, 2014) e alvo farmacológico. A serotonina modula os neurônios dopaminérgicos nos núcleos da base e o aumento da atividade de sua via de transmissão parece diminuir os efeitos discinéticos da L-DOPA, já que foi demonstrado que o eltoprazina, agonista de receptores serotoninérgicos, como o 5-HT_{1A/1B}, diminuiu a discinesia induzida por L-DOPA, ao mesmo tempo em que reduziu os efeitos anti-parkinsonianos da L-DOPA (BEZARD *et al.*, 2013). Outro estudo do mesmo grupo mostrou que a associação entre eltoprazina e preladenante, um antagonista de receptor A2A de adenosina, diminuiu a discinesia sem diminuir os efeitos anti-parkinsonianos da L-DOPA (PINNA *et al.*, 2016).

O aumento da expressão de catecol-O-metil transferase (COMT) altera as comunicações no corpo estriado conferindo maior suscetibilidade a discinesia induzida por L-DOPA em camundongos, relacionando assim o aumento da metabolização de serotonina e dopamina com o desenvolvimento de discinesia (SOLIS *et al.*, 2017). A administração crônica de inibidores da recaptação de serotonina, como a paroxetina e o escitalopram, diminuem o

desenvolvimento de discinesia em ratos lesionados pela 6-OHDA e tratados com L-DOPA, sem diminuir os efeitos positivos do tratamento com L-DOPA para a DP (CONTI *et al.*, 2014).

Evidências sugerem que a inflamação também tenha papel importante na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA. Barnum e colaboradores (2008) demonstraram que a administração exógena de corticosterona reduziu a discinesia induzida por L-DOPA em ratos parkinsonianos. BORTOLANZA e colaboradores (2015) demonstraram que a astrogliose e a microgliose estão aumentadas em ratos hemiparkinsonianos lesionados com 6-OHDA após a administração de L-DOPA/benserazida. Outro trabalho do mesmo grupo demonstrou haver aumento da expressão de COX-2 após a administração de L-DOPA em ratos hemiparkinsonianos (BORTOLANZA *et al.*, 2016). Apesar destes achados, ainda não existem estudos clínicos demonstrando a participação da neuroinflamação no processo fisiopatológico da discinesia, apesar deste mecanismo já estar bem estabelecido na fisiopatologia da DP em si. Mais estudos ainda são necessários para que se comprove esta participação.

1.5 Modelos experimentais de DP e de discinesia induzida por L-DOPA em animais

A DP tem sido amplamente estudada através de modelos experimentais que são capazes de reproduzir a perda de neurônios dopaminérgicos que ocorre na doença. O emprego desses modelos tem contribuído para o conhecimento dos mecanismos patológicos da doença, além disso, tem permitido a formulação de várias hipóteses para explicar os processos neurodegenerativos do sistema nervoso central, possibilitando a pesquisa por novos agentes terapêuticos que venham a ser úteis no tratamento da DP.

Deste modo foram desenvolvidos modelos animais utilizando-se neurotoxinas dopaminérgicas e modelos de linhagens modificadas geneticamente direcionada a genes relevantes para a doença. Assim, foram introduzidos agentes que seletivamente lesam e destroem os sistemas catecolaminérgicos, tais como as toxinas MPTP e a 6-OHDA (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003; FRANCARDO; CENCI, 2014). Além desses, alguns agentes químicos utilizados na agricultura como a rotenona e o paraquat, quando administrados sistemicamente, podem induzir algumas das características da DP, apesar de serem menos reproduzíveis (JAGMAG *et al.*, 2016).

A 6-OHDA é uma das neurotoxinas mais comuns utilizadas experimentalmente em modelos de degeneração da substância negra, tanto *in vitro* como *in vivo* (SCHOBER, 2004). Ela é incapaz de atravessar a barreira hemato-encefálica, sendo necessária a administração diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar. A injeção bilateral de 6-OHDA na SNpc ou em outras regiões cerebrais provoca uma elevada mortalidade neuronal, principalmente dos neurônios catecolaminérgicos. Esta droga apresenta similaridade estrutural com as catecolaminas e tem alta afinidade pelo sistema de transporte das mesmas, mostrando assim a sua seletividade por neurônios catecolaminérgicos. Produz lesões na SNpc pela indução da produção de peróxido de hidrogênio e espécies reativas do oxigênio, como radical hidroxil, e também pela inibição do complexo I mitocondrial (BLUM *et al.*, 2001).

A 6-OHDA é usualmente injetada unilateralmente, enquanto o hemisfério intacto serve como controle interno. Esta injeção unilateral representa o modelo conhecido como “hemi-parkinsoniano” (PERESE *et al.*, 1989), que se caracteriza por um comportamento de assimetria motora após a administração de drogas dopaminérgicas, devido ao desequilíbrio fisiológico entre o corpo estriado lesionado e o não-lesionado (BETARBET *et al.*, 2002). Por isso, os animais apresentarão um comportamento rotacional contralateral no sentido do hemisfério o qual a estimulação do receptor dopaminérgico for predominante. O comportamento rotacional pode ser quantificado e correlacionado com o grau da lesão, sendo assim a maior vantagem desse modelo (BEAL, 2001).

Os ratos são animais com o melhor custo-benefício para estudar drogas neuroprotetoras no modelo de Doença de Parkinson. Assim como para avaliar problemas motores relacionados à DP como a acinesia, e ao tratamento com L-DOPA, como a discinesia (FRANCARDO; CENCI, 2014; LUNDBLAD *et al.*, 2002). Para entender os mecanismos de discinesia induzidos por L-DOPA e os possíveis tratamentos, lançam-se mão de dois modelos de movimentos involuntários que ocorrem na DP. O primeiro é a administração de L-DOPA em ratos lesionados com a neurotoxina 6-OHDA onde se observam os movimentos involuntários anormais (CENCI; OHLIN, 2009; BASTIDE *et al.*, 2015). O segundo é a administração de L-DOPA em primatas não-humanos tratados com MPTP que irão desenvolver movimentos do tipo coréia e distonia, semelhantes aos que ocorrem em pacientes com DP (JENNER, 2008).

O modelo utilizado no presente trabalho foi o de indução de AIMS através da administração crônica de L-DOPA em ratos *Wistar* albinos lesionados com 6-OHDA. Não existe um consenso geral de qual a melhor dose e via de administração na qual a L-DOPA seja capaz de induzir AIMS em ratos. Alguns autores utilizam a administração de L-DOPA via i.p. na dose de 4 mg/kg e na dose de 6 mg/kg (BARNUM *et al.*, 2009), outros autores administraram via s.c. a dose de 6 mg/kg (TRONCI *et al.*, 2013; CONTI *et al.*, 2014), e também via i.p. a dose de 20 mg/kg durante 10 dias (DOO *et al.*, 2014). O modelo que foi utilizado neste trabalho foi o mesmo utilizado por DEL-BEL e colaboradores (2014) no qual se administra por gavagem a L-DOPA na dose de 30 mg/kg associada a benserazida (7,5 mg/kg) uma vez ao dia durante 22 dias.

1.6 Modulação da neurotransmissão dopaminérgica pelo ATP

O ATP é a principal molécula de troca de energia utilizada pelas células em seu metabolismo normal. No ano de 1972 foi proposto que o ATP também teria a função de neurotransmissor. Burnstock em 1985 descreveu o papel do ATP como neurotransmissor e dividiu seus receptores P2 em duas famílias: P2Y, receptores metabotrópicos, e P2X, ionotrópicos (GEVER *et al.*, 2006). Os receptores são agrupados separadamente em receptores A ou P1, receptores de adenosina, e P2 os receptores de ATP e outras purinas fosforiladas. Os receptores P2 ainda são divididos em metabotrópicos, P2Y, e ionotrópicos, P2X (RALEVIC & BURNSTOCK, 1998). Além de agir como neurotransmissor isolado, a liberação vesicular de ATP está co-localizada com outros neurotransmissores como acetilcolina, noradrenalina, GABA, DA e glutamato. Assim, o ATP pode interagir com outros neurotransmissores ou fatores de crescimento, modulando seus efeitos (BURNSTOCK, 2004). Sabe-se que os receptores P2X7 estão relacionados principalmente à inflamação no SNC, podendo-se encontrar receptores P2X7 em neurônios e em células da glia, como micróglia e astrócitos (ARULKUMARAN *et al.*, 2011; SPERLÁGH; ILLES, 2014). O receptor P2X7 é um canal iônico, permeável ao Na⁺ e ao Ca²⁺, que permite a passagem não seletiva de moléculas grandes, como íons e solutos até 900 Da, formando verdadeiros poros na membrana celular e estão implicados diretamente com a neuroinflamação (BARTLETT *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que a adenosina endógena e o ATP modulam a neurotransmissão nas principais projeções alvo dos neurônios dopaminérgicos, como núcleo *accubens* (NAc) e área tegmental ventral (KRÜGEL *et al.*, 2001,

2003), assim como em sua origem, no mesencéfalo (KRÜGEL *et al.*, 2001, 2003, 2004). O envolvimento dos receptores purinérgicos no funcionamento dos núcleos basais já está bem demonstrado, visto que o ATP aumenta os níveis de dopamina extracelular no corpo estriado de ratos através da estimulação de receptores P2Y (ZHANG *et al.*, 1995). Por outro lado a dopamina facilita a ativação de receptores P2X pelo ATP (INOUE *et al.*, 1992) o que pode sugerir uma participação dos receptores P2 na flutuação de liberação de dopamina nos núcleos basais, importante mecanismo responsável pelo surgimento da discinesia induzida por L-DOPA. Além disso, foi identificado um aumento do número de receptores A2A em cérebros humanos *post-mortem* de indivíduos com DP. Antagonistas A2A melhoram o efeito do tratamento com L-DOPA e ao mesmo tempo são capazes de diminuir a discinesia induzida por L-DOPA (JIMENEZ-URBIETA *et al.*, 2015).

A adenosina tem atuação diferente do ATP no SNC. O bloqueio de receptores A2A diminui a formação de discinesia, o uso de antagonistas como o preladenate e a istradefilina demonstram melhorar o efeito anti-parkinsoniano da L-DOPA (PINNA *et al.*, 2016). Estudos mais recentes mostram que a istradefilina é capaz de diminuir o desenvolvimento de discinesia induzida por L-DOPA em macacos lesionados por MPTP (UCHIDA *et al.*, 2015; KO *et al.*, 2016). Os receptores A2A estão presentes nos núcleos basais, mais especificamente no corpo estriado, sendo encontrados na região pós-sináptica, junto aos receptores D2, junto a neurônios corticoestriatais glutamatérgicos e ainda em células da glia. São encontrados também pré-sinápticamente nas regiões *caudato* e *putamem* do corpo estriado (ROSIN *et al.*, 2003). A relação dos receptores A2A com a DP se deve ao fato de que os receptores A2A controlam a função do receptor dopaminérgico D2, tanto por alterar a sinalização intracelular, bem como através da formação de heterodímeros entre os receptores D2 e A2A (GOMES *et al.*, 2011).

A liberação de ATP dos neurônios lesados causa à morte de células adjacentes que expressam receptores P2X7, levando ao aumento do volume necrótico, fenômeno ligado a fisiopatologia da DP (BURNSTOCK, 2008). CHOI e colaboradores (2009) demonstraram que 65 % dos neurônios dopaminérgicos expressam RNAm para receptores P2X, principalmente os subtipos P2X2, P2X4 e P2X6, e que o ATP modula os disparos espontâneos nos neurônios da substância negra *pars compacta* possivelmente através desses receptores. As taxas de disparos espontâneos neuronais estão diretamente relacionadas aos níveis basais de Ca^{2+} e que o ATP aumenta a atividade de disparos nos neurônios dopaminérgicos mesmo em altas concentrações, como 1 mM. Isso poderia levar a um elevado acúmulo de Ca^{2+} e causar toxicidade em certas

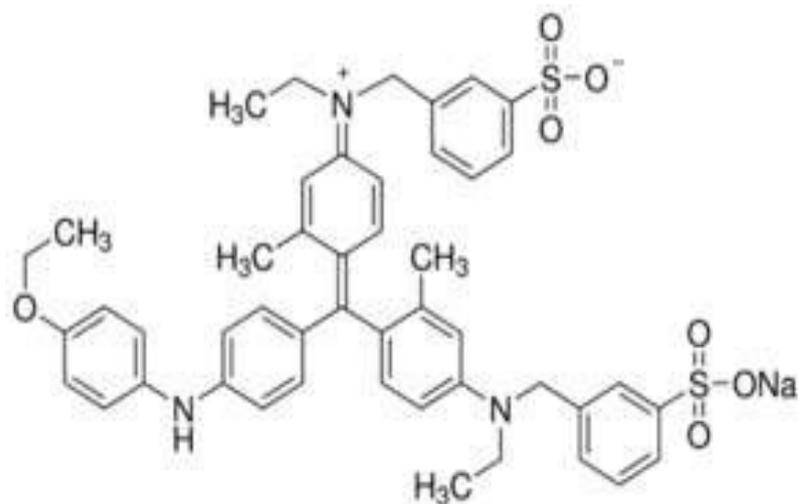
condições como convulsões, hipóxia e isquemia, podendo ser mais deletério aos neurônios dopaminérgicos (CHOI *et al.*, 2009).

Além disso, como receptores P2X são permeáveis ao Ca^{2+} e a exocitose vesicular é Ca^{2+} -dependente, sendo assim seria razoável especular que receptores P2X podem elevar a aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , conseqüentemente levando a exocitose de vesículas contendo dopamina (BARTLETT *et al.*, 2014).

Os receptores P2X7 são canais iônicos permeáveis por moléculas de alto peso molecular, predominantemente expresso em células imunes, como macrófagos e monócitos, células da glia, como microglia e astrócitos, e algumas de suas subunidades estão expressas em células epiteliais, fibroblastos, osteoblastos entre outros. Medeia a liberação de mediadores inflamatórios como citocinas, proliferação celular e apoptose (GEVER *et al.*, 2006). Os receptores P2X7 participam da degeneração neuronal do SNC através da neuroinflamação e neurotoxicidade mediada pela micróglia levando a morte neuronal (SKAPER *et al.*, 2005). O antagonismo dos receptores P2X7 estão relacionados a diversas doenças do SNC como depressão, doença de Alzheimer, DP, esclerose, isquemia, epilepsia, entre outros (PUCHAŁOWICZ *et al.*, 2014). Assim, estudar os efeitos de um antagonista seletivo de receptor P2X7, o *brilliant blue G* (BBG), se torna importante para entender qual o papel dos receptores purinérgicos na fisiopatologia da discinesia.

O BBG é um corante que foi primeiramente utilizado na indústria têxtil. Foi utilizado em pesquisas médicas pela primeira vez na década de 80. Devido à sua ação antagonista de receptores purinérgicos P2X7 tem sido largamente utilizado como ferramenta farmacológica para o estudo do sistema purinérgico (BARTLETT *et al.*, 2014). O BBG possui ação antagonista do receptor P2X7 abaixo da concentração de $1\ \mu\text{M}$. Doses abaixo de 50 mg/kg atravessam facilmente a barreira hemato-encefálica, chegando á concentração de $1\ \mu\text{M}$. Nesta concentração o BBG também inibe receptores de panexina, Panx1 (SPERLÁGH; ILLES, 2014).

Figura 5 – Estrutura molecular do BBG.



Fonte: Wikipedia Commons.

O BBG possui atividade neuroprotetora em diversos modelos animais de doenças neurodegenerativas, como a DP (CARMO *et al.*, 2014), isquemia cerebral (WIRKNER *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2015), doença de Alzheimer (RYU; MCLARNON, 2008), doença de Huntington (DIAZ-HERNANDEZ *et al.*, 2009), esclerose lateral amiotrófica (BARTLETT *et al.*, 2017), dentre outros. A administração de BBG leva a redução da expressão de receptores P2X7 na superfície de neurônios de ratos (RYU; MCLARNON, 2008) e melhora a função cognitiva de animais em modelo experimental de doença de Alzheimer (CHEN *et al.*, 2015).

2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

A Doença de Parkinson é uma doença neurodegenerativa progressiva que atinge aproximadamente 1 % da população mundial com idade acima de 65 anos. O número de casos da doença tem aumentado a cada ano devido ao envelhecimento da população mundial. É descrita como um distúrbio motor em que os pacientes apresentam tremor, rigidez muscular, bradicinesia e distúrbios posturais. O atual tratamento é baseado na reposição dopaminérgica com o precursor L-DOPA e induz a importantes efeitos colaterais como a discinesia, que muitas vezes é mais incapacitante que a própria doença e que pode levar a interrupção do tratamento. Portanto, faz-se necessária a investigação dos mecanismos que levam a indução da discinesia relacionado ao uso crônico de L-DOPA em pacientes acometidos pela Doença de Parkinson para que possamos partir em busca de terapias de suporte que diminuam os efeitos adversos causados pelo tratamento e melhorem a qualidade de vida desses pacientes.

Assim estudar o possível envolvimento dos receptores de purinas na fisiopatologia da discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA é de extrema importância. Além disso, antagonistas purinérgicos têm sido largamente estudados como novas terapias para a DP. Os receptores purinérgicos possuem papel importante na fisiopatologia da doença e o antagonismo do receptor P2X7, através do uso do BBG, possui ação neuroprotetora frente as alterações motoras e não-motoras em modelos experimentais. Assim, torna-se extremamente relevante o estudo dos possíveis efeitos neuroprotetores do BBG, antagonista seletivo P2X7, na discinesia induzida por L-DOPA. Tornando assim o receptor P2X7 um possível alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, através do desenvolvimento de uma possível nova droga utilizada como monoterapia no controle dos sintomas motores e não-motores em pacientes com DP, ou ainda como adjuvante no tratamento com L-DOPA, diminuindo as doses necessárias para o controle dos sintomas motores e diminuindo o desenvolvimento dos efeitos colaterais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Investigar a participação do receptor de purinas, P2X7 sobre discinesia induzida por L-DOPA em ratos com parkinsonismo experimental e o possível efeito neuroprotetor do antagonista seletivo do receptor P2X7, o BBG.

3.2 Objetivos Específicos

Avaliar se o BBG:

- Previne a indução de movimentos involuntários anormais induzidos pela L-DOPA em ratos com parkinsonismo experimental;
- Previne a indução de alterações de coordenação motora induzidos pela L-DOPA em ratos com parkinsonismo experimental;
- Previne a degeneração neuronal (Fluoro-jade C, TH) no corpo estriado e mesencéfalo em ratos com parkinsonismo experimental tratados com L-DOPA;
- Previne as alterações no transportador de dopamina (DAT) no corpo estriado e mesencéfalo induzidas pela L-DOPA em ratos com parkinsonismo experimental;
- Previne as alterações na expressão dos receptores dopaminérgicos D1 e D2 em ratos com parkinsonismo experimental tratados com L-DOPA;
- Previne as alterações de transdução de sinal em neurônios dopaminérgicos (DARPP-32 e pDARPP-32) induzidas por L-DOPA em ratos com parkinsonismo experimental;
- Previne a astrogliose e microgliose (GFAP, CD11-b) no corpo estriado e mesencéfalo de ratos com parkinsonismo experimental tratados com L-DOPA;
- Previne a neuroinflamação através da diminuição da ativação de COX-2 no corpo estriado e mesencéfalo de ratos com parkinsonismo experimental tratados com L-DOPA;
- Previne o aumento da expressão de IL-1 β no corpo estriado e mesencéfalo de ratos com parkinsonismo experimental tratados com L-DOPA.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus albinus*) da variedade *Wistar*, pesando entre 250 e 300 g, idade aproximada de 51 dias, machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos à temperatura de 25 °C em ciclos de 12 horas de claro/escuro e livre acesso a água e a comida. No que se refere aos cuidados com os animais, este estudo seguiu os princípios éticos da experimentação animal estabelecidos pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob número 107/2014.

4.2 Drogas

Foram utilizadas 6-hidroxidopamina (Sigma-Aldrich®-USA); L-DOPA/Benserazida (Roche®-Brasil); Ketamina 90 mg/mL (Vetanarcol®); Xilazina 10 mg/mL (Rompum®), BBG (Sigma-Aldrich®-USA).

4.3 Protocolo Experimental

Ao todo foram utilizados 106 animais divididos em 7 grupos (Tabela 1). O tratamento com L-DOPA foi realizado dissolvendo-se um comprimido dispersível do medicamento Prolopa® (Roche®-Brasil) contendo L-DOPA (100 mg) e benserazida (25 mg) em 20 mL de água destilada (veículo), resultando em uma concentração de 0,005 g/mL. Cada animal recebeu 0,6 mL da solução a cada 100 g de peso corpóreo, resultando na dose de 30 mg/kg (PANDOVAN-NETO *et al.*, 2009). A L-DOPA foi administrada por via oral (gavagem), uma vez ao dia, durante 22 dias. Foi preparado uma solução de BBG na concentração de 13,5 mg/mL dissolvido no veículo salina (NaCl 0,9 %). O tratamento com o BBG foi realizado nas doses de 22,5 e 45 mg/kg i.p. (CARMO *et al.*, 2014), a cada 48 h, durante 22 dias, concomitantemente ao tratamento com L-DOPA, para os grupos específicos (Tabela 1).

Os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para administração da toxina 6-OHDA a fim de induzir a lesão estriatal. A seleção dos animais se deu através do teste rotacional com apomorfina 14 dias após a administração de 6-OHDA, onde apenas aqueles que obtiverem um número maior que 80 rotações foram selecionados para receber os tratamentos

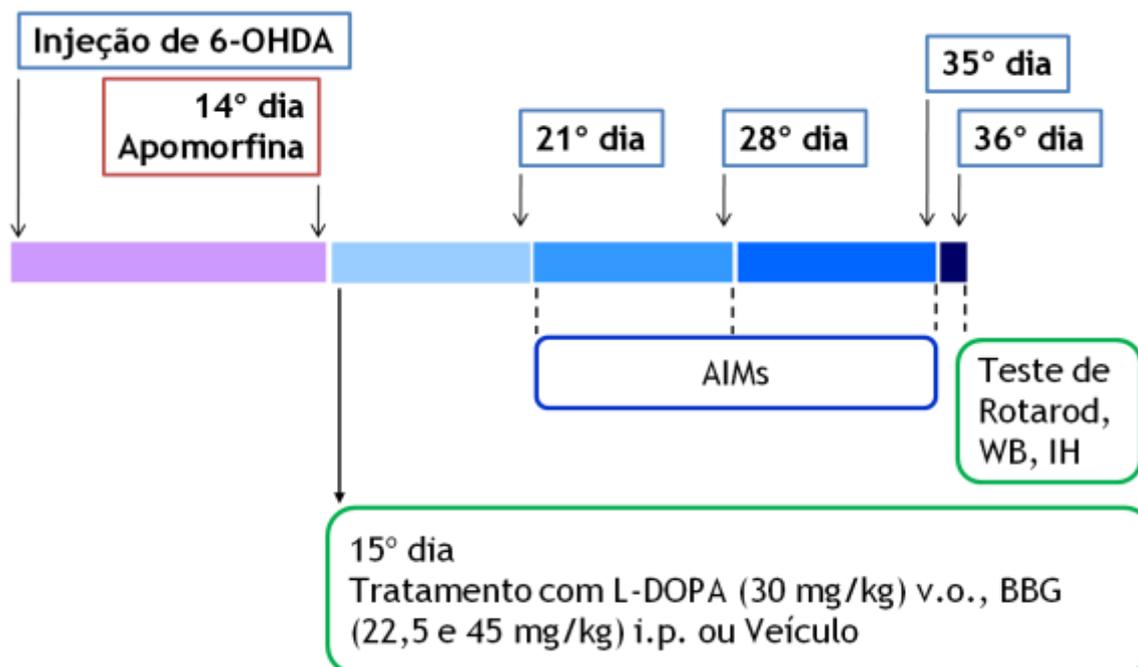
com L-DOPA e BBG. Ao todo 8 animais não atingiram o perfil para serem selecionados e, portanto, foram descartados. Sendo assim, o número de animais que deram seguimento ao protocolo foi de 98 animais.

Tabela 1 – Grupos e tratamentos

Grupos	Tratamento	Nº de animais	
1	FO	Veículo intraestriatal + veículo L-DOPA (v.o.) + veículo BBG (i.p.)	14
2	FO + BBG	Veículo intraestriatal + veículo L-DOPA (v.o.) + BBG 45mg/kg (i.p.)	14
3	FO + L-DOPA	Veículo intraestriatal + L-DOPA 30 mg/kg (v.o.) + veículo BBG (i.p.)	14
4	PARK	6-OHDA (18 µg/3µL intraestriatal) + veículo L-DOPA (v.o.) + veículo BBG (i.p.)	14
5	PARK + L-DOPA	6-OHDA (18 µg/3µL intraestriatal) + L-DOPA 30 mg/kg (v.o.) + veículo BBG (i.p.)	14
6	PARK + L-DOPA + BBG 22,5 mg/kg	6-OHDA (18µ g/3µL intraestriatal) + L-DOPA 30 mg/kg (v.o.) + BBG 22,5 mg/kg (i.p.)	14
7	PARK + L-DOPA + BBG 45 mg/kg	6-OHDA (18µ g/3µ L, intraestriatal) + L-DOPA 30 mg/kg (v.o.) + BBG 45 mg/kg (i.p.)	14
Total			98

Os movimentos involuntários anormais (AIMs), que avaliam o desenvolvimento de discinesia, foram realizados nos dias 7, 14 e 21 após o início do tratamento com L-DOPA, que correspondem ao 21º, 28º e 35º dias após a cirurgia para injeção da 6-OHDA. O teste que avalia a alteração da coordenação motora (teste do rotarod) foi realizado no 36º dia após a cirurgia, que corresponde ao 22º dia após o início do tratamento com L-DOPA de acordo com o desenho experimental na figura 6. Após os testes de comportamento, AIMs e rotarod (n=14), cada grupo foi subdividido e os animais eutanasiados por decaptação, devido à necessidade de acesso ao tecido cerebral. Depois as áreas cerebrais correspondentes ao estriado direito e mesencéfalo foram dissecadas. Um subgrupo dos animais (n=4) foi utilizada para a realização da avaliação da expressão de receptores dopaminérgicos (D1, D2), transdução de sinal intracelular através da relação entre a expressão de DARPP-32 total e fosforilada na treonina 34 (pDARPP-32Thr34/DARPP-32tot), e de IL-1β pela técnica de western-blot. E outro subgrupo (n=4) foi utilizada para a avaliação da degeneração neuronal e da neuroinflamação (Fluoro-jade C, TH, DAT, GFAP, CD11-b, COX-2) através de técnicas de histologia e imunohistoquímica (Figura 6).

Figura 6. Desenho experimental



4.4 Lesão intraestriatal por 6-OHDA

O modelo experimental de lesão do corpo estriado foi proposto por Ungerstedt (1968). Os animais foram anestesiados com xilazina (10 mg/kg via i.p.) e ketamina (90 mg/kg via intramuscular) e posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting®). Os procedimentos de lesão do corpo estriado foram realizados através de cirurgia estereotáxica. Foi realizada uma incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento com um bisturi, no alto do crânio, expondo-se as suturas ósseas cranianas, com o objetivo de localizar o bregma. Três coordenadas de acesso ao corpo estriado foram marcadas de acordo com o atlas de PAXINOS; WATSON (1984).

Foram realizadas perfurações nos crânios dos animais com uma broca de baixa rotação (Dremel) em cada marcação, permitindo a entrada da seringa *Hamilton* com a 6-OHDA diretamente no corpo estriado. As lesões foram feitas unilateralmente, apenas no hemisfério direito dos animais. Os animais receberam três microinjeções de 6-OHDA na concentração de 6 µg/µL em cada sítio, perfazendo um total de 18 µg/3µL. Os sítios onde a lesão foi realizada situam-se nas coordenadas descritas na Tabela 2. Após as injeções, os animais foram suturados com fio cirúrgico de algodão (AP 0,4 15x45 cm) e o local desinfetado com iodopovidona 9 %. Os animais do grupo falso-operado foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, no entanto, não receberam a neurotoxina 6-OHDA. Foi somente introduzida à agulha nas

mesmas coordenadas estereotáticas, seguido de infusão de salina estéril com ácido ascórbico a 0,02 % (veículo para 6-OHDA).

Tabela 2 - Sítios das lesões estriatais unilaterais com a 6-OHDA

Coordenadas estriatais	1 ^a	2 ^a	3 ^a
Antero-posterior (A-P)	+ 0,5	- 0,5	- 0,9
Medio-lateral (M-L)	- 2,5	- 3,0	- 3,7
Dorso-ventral (D-V)	+ 5,0	+ 6,0	+ 6,5

Fonte: PAXINOS; WATSON, 1984.

4.5 Teste rotacional induzido por apomorfina

A apomorfina é uma substância agonista dopaminérgica capaz de induzir o aumento da função motora dos animais. Este teste é utilizado para avaliação da lesão unilateral induzida pela 6-OHDA em ratos. A apomorfina induz o movimento rotacional para o lado contralateral a lesão causada pela injeção unilateral de 6-OHDA no corpo estriado. O teste consiste na observação do número de rotações contralaterais a lesão durante 60 minutos após a administração de 1 mg/kg i.p. de apomorfina (UNGERSTEDT, 1971).

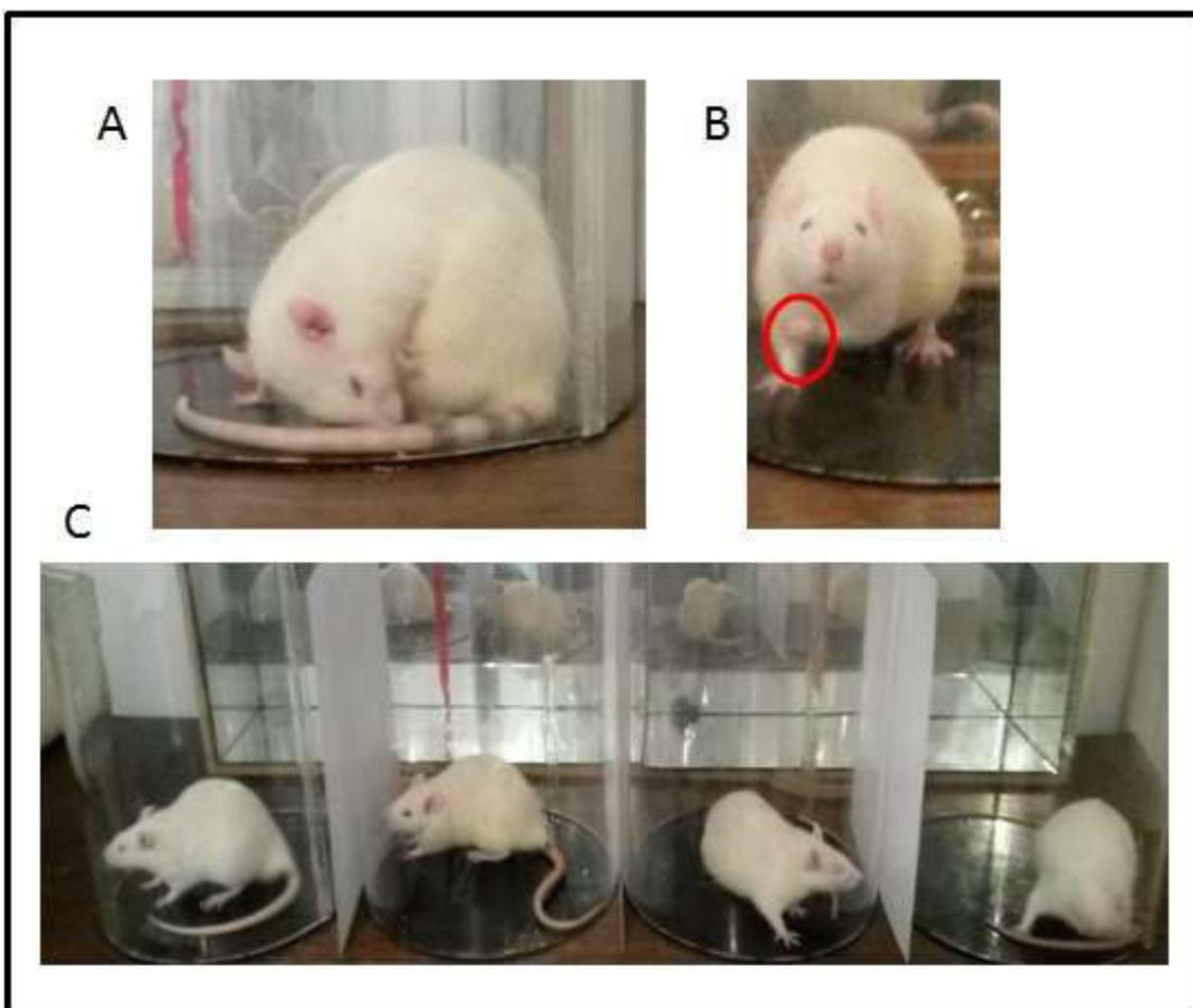
4.6 Movimentos involuntários anormais

As desordens do movimento que são apresentadas nos pacientes após o tratamento crônico com L-DOPA podem ser mimetizadas em roedores através da observação dos movimentos involuntários anormais (AIMs) que são expressos após tratamento com L-DOPA (LUNDBLAD *et al.*, 2002). Os animais foram observados nos dias 7, 14 e 21 após o início do tratamento com L-DOPA entre 9:00 e 16:00 h. O teste realizado foi cego. Para quantificação dos AIMs, a L-DOPA foi administrada 30 minutos após a administração de BBG e os animais foram observados 20 minutos após a administração da L-DOPA. Cada animal foi individualmente observado a cada 20 minutos entre 20 e 120 minutos após a administração de L-DOPA. Cada observação teve a duração de 2 minutos. Os AIMs tendem a voltar para o basal após 140 minutos da administração de L-DOPA.

Os AIMs foram classificados em quatro subtipos: 1. AIMs axiais - postura distônica, torção coreiforme do pescoço, torção do corpo por cima do próprio eixo para o lado contralateral a lesão (Figura 7 A); 2. AIMs dos membros- movimento anormal e desproporcional

dos membros anteriores e digito-pressão (Figura 7 B destacado pelo círculo vermelho); 3. AIMs orolinguais - mastigação involuntária e protusão da língua contralateral a lesão; 4. AIMs locomotores- movimento circular com as quatro patas no chão contralateral a lesão (Figura 7 C). Cada um dos quatro subtipos recebeu um escore de acordo com uma escala de severidade de 0 a 4, sendo 0 sem movimento involuntário, 1 movimento presente em menos da metade do tempo de observação, 2 presente em mais da metade do tempo de observação, 3 presente em todo o tempo de observação, mas suprimido por estímulo sonoro, e 4 presente em todo o tempo de observação porém não suprimido por estímulo sonoro. O escore mínimo é 0 e o máximo 96. Os resultados são apresentados agrupando os subtipos axiais, de membros e orolinguais, designados pela sigla ALO AIMs, e separadamente os AIMs locomotores.

Figura 7. Subtipos de AIMs



Fonte: Arquivo do Laboratório de Neurociências e Comportamento – NPDM – UFC.

4.7 Avaliação da coordenação motora - Teste de rotarod

Foi utilizado o equipamento rotarod (Figura 8), para avaliar a coordenação motora e alterações de equilíbrio no roedor. O protocolo utilizado foi descrito por PADOVAN-NETO e colaboradores (2009). Baseia-se na habilidade de roedores em manter o equilíbrio e a caminhada em um cilindro em rotação. Para tanto foi necessário que descartar a influência da lesão por 6-OHDA na coordenação motora dos animais.

Figura 8. Aparelho de Rotarod



Fonte: Insight LTDA.

O protocolo utilizado consiste na avaliação dos déficits de coordenação motora induzidos por L-DOPA através da observação do desempenho no rotarod 1 e 2 h após a administração de L-DOPA em relação a um pré-teste realizado 30 minutos antes da administração de L-DOPA. Foi realizado no 37º dia após a injeção de 6-OHDA. O aparelho consiste de uma haste estriada (diâmetro: 3 cm) separados em quatro compartimentos (largura: 5 cm), com 20 cm de altura a partir de quatro pranchas de inclinação. Os animais foram treinados três dias antes da cirurgia em duas sessões. Os animais foram colocados sobre a haste rotativa em condições de aceleração 16-38 rpm durante 300 s em cada sessão. No dia do teste foi realizado o pré-teste 30 minutos antes da administração das drogas e foi registrado o tempo (latência) que o animal é capaz de andar sobre a haste em rotação constante (20 rpm) antes de queda (tempo máximo: 300 s). Após a queda ou 300 s, os animais foram removidos do aparelho e colocados em suas caixas para descanso. Seguiu-se a administração do BBG nos grupos específicos. Após 30 minutos da administração do BBG foi então administrado 30

mg/kg de L-DOPA v.o. Os animais retornaram para o aparelho 1 e 2 h após a administração de L-DOPA e então foi registrado a latência do animal antes de queda (tempo máximo: 300 s). O resultado foi expresso através do seguinte cálculo:

$$\left(\frac{\text{média da latência (1 e 2 h)}}{\text{latência pré - teste}} \right) \times 100$$

4.8 Análise histológica e imunohistoquímica

Após a anestesia, os animais foram perfundidos através do coração pelo ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4 % em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados com formol tamponado por 24 horas. Após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30 %. O tecido foi cortado no criostato (Leica CM3050 S, Alemanha) e armazenados em placa de 24 poços e foram armazenados *free-floating* em PBS com azida a 0,01 % a 4 °C até análise.

4.8.1 Imunomarcção para TH, DAT e COX-2

Para a realização da imunohistoquímica para TH, DAT e COX-2 as fatias da região estriatal e mesencefálica foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos, o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio 0,3 % (H₂O₂) durante 10 (dez) minutos e depois lavado mais 2 (duas) vezes por 5 (cinco) minutos em PBS. Foram incubados fatias separadas para os anticorpos primários anti-TH (*mouse*, 1:800, SIGMA), anti-DAT (*goat*, 1:500, Santa Cruz), anti-COX2 (*goat*, 1:200, Santa Cruz) em albumina bovina 5 % (BSA) durante a noite a 4 °C. No outro dia as fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS, sendo em seguida incubadas com os anticorpos secundários biotinilados diluído na solução de bloqueio *goat anti-mouse* IgG (1:200; Vector labs), *donkey anti-goat* (1:300, Vector Labs), respectivamente para TH, DAT e COX-2, por 2 horas a TA, e enxaguados novamente três vezes com PBS. O método ABC (Vector Labs) foi utilizado por 40 minutos a temperatura ambiente para a amplificação do sinal, sendo a marcação revelada com 3,3'-diaminobenzidina (*DAB Peroxidase Substrate Kit*; Vector labs). A reação foi interrompida, lavando-se as fatias em PBS antes de realizar a montagem em lâminas gelatinizadas. Após secagem, as fatias foram desidratadas em gradiente de etanol e clarificadas com xileno, sendo finalmente cobertas com lamínulas utilizando-se o meio de montagem Eukitt (Fluka-Sigma). Os cortes foram visualizados no microscópio Zeiss Imager Z2 e a imunorreatividade para TH e DAT mensurada pela análise semi-quantitativa da

densidade óptica utilizando-se o software Image J. Foi feita uma média para os valores obtidos para o grupo controle (FO) e todos os outros foram calculados como porcentagem desse valor. A imunorreatividade para COX-2 foi mensurada através da contagem do número de células COX-2 positivas utilizando-se o software Image J.

4.8.2 Coloração com Fluoro-jade C

A técnica de coloração por Fluoro-jade C tem por objetivo a avaliação de neurônios em processo de degeneração (SCHMUED *et al.*, 2005). As fatias cerebrais das regiões estriatal e mesencefálica foram hidratadas em água destilada, depois colocadas em solução de permanganato de potássio 0,06 % por 6 minutos. Foram então lavadas em banho de água destilada durante 1 minuto. Em seguida, incubadas em solução de Fluoro-jade C 0,001 % em ácido acético 0,1 %, durante 15 minutos. Após esse período, as fatias foram lavadas 3 vezes com água destilada por 3 minutos. Para a montagem das lâminas foi realizada a desidratação em álcool (50, 70 e 100 %), diafanizadas e utilizado meio de montagem à base de xilol (Entelan®). Os cortes foram visualizados em microscópio confocal (Laser scanning, LSM 510 META, Zeiss). A fluorescência desenvolvida foi quantificada em fatias (50 µm de espessura e espaçamento de 300 µm) representativas do estriado e mesencéfalo. A quantificação da Intensidade de Fluorescência (IF) utilizada foi calculada através do programa Image J.

4.8.3 Imunofluorescência para GFAP, CD11-b

Para a realização da imunofluorescência para GFAP e CD11-b as fatias foram lavadas três vezes com tampão fosfato (PBS, pH 7.4) por 5 (cinco) minutos. Em seguida foram bloqueadas com PBS contendo 5 % de soro de cavalo durante 45 minutos. Depois se realizou a dupla marcação por 48 horas a 4 °C com anticorpo anti-GFAP (*rabbit*, 1:1000, SIGMA) em combinação com anti-CD11b (*mouse*, 1:200, Serotec) diluídos em PBS com 0,25 % de Triton-X100 e 5 % de soro de cavalo. Após os períodos de incubação as fatias foram então lavadas 3 vezes por 10 minutos em PBS com 0,25 % de Triton-X100 e subsequentemente incubadas por 2 horas a temperatura ambiente com os anticorpos secundários *donkey anti-rabbit* IgG conjugado com AlexaFluor 594 e *donkey anti-mouse* IgG conjugado com AlexaFluor 488 (Life Tech) respectivamente para GFAP e CD11-b diluídos 1:500 em PBS com 0,25 % de Triton-X100 e 5 % de soro de cavalo. Após lavar 3 vezes em PBS por 5 minutos cada, as fatias foram montadas em lâminas gelatinizadas com o meio de montagem fluorescente Dako

(Dako, USA). Os cortes foram visualizados em microscópio confocal (Laser scanning, LSM 510 META, Zeiss).

A imunorreatividade para GFAP e CD11b foram quantificadas em fatias (50 μ m de espessura e espaçamento de 300 μ m) representativas do estriado e mesencéfalo. A quantificação de Intensidade de Fluorescência (IF) utilizada para mensurar a imunorreatividade e foi calculada através do programa Image J.

4.9 Western-blot

As amostras de tecido do corpo estriado e mesencéfalo foram homogeneizadas separadamente por homogeneizador elétrico com 1 mL de tampão RIPA (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, NP-40 1 %, EDTA 1 mM, EGTA 1 Mm, Triton X-100 1%, PMSF 1 mM, Inibidor de protease 0,1 %). As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 13.000 g durante 15 min a 4°C. A quantidade de proteína total presente na amostra foi determinada usando o sobrenadante através do método de Lowry, e a albumina sérica bovina utilizada como padrão.

As amostras foram desnaturadas por adição de um tampão contendo – Tris 125 mM, glicerol 20%, DTT 100 mM, SDS 4%, e de Azul de Bromofenol 0,02% - seguida de aquecimento a 90 °C durante 5 min. Quantidades iguais de proteínas totais (65 μ g) foram aplicadas em cada poço de gel de poliacrilamida-SDS 12,5 %, utilizando-se o sistema *Mini Protean@3Cell* (Bio-Rad, EUA). Adicionou-se tampão de corrida (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e SDS 0,1 %) e em seguida iniciou-se a corrida em condições constantes de voltagem e variáveis de miliamperagem por 2 h. Após a separação proteica se deu o início da transferência (*overnight*, 100 V, 395 mA) para a membrana PVDF (BIO RAD), previamente ativada por imersão em metanol durante 5 s, seguida de um a imersão de 5 min em água, e finalmente em tampão de eletrotransferência (Tris 25 mM; Glicina 192 mM e Metanol 20 %) durante 5 min.

Após a transferência as membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 5 % em TBS-T por uma hora, sob agitação, à temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram incubadas em TBS-T *overnight* contendo os seguintes anticorpos primários: DARPP-32 (*rabbit*, 1:1500, Cell signalig), pDARPP-32 (*goat*, 1:1500, Santa Cruz), D1 (*rabbit*, 1:500, ABCAM), D2 (*rabbit*, 1:800, ABCAM), IL-1 β (*rabbit*, 1:500, Santa Cruz) e α -tubulina (*rabbit*, 1:500, Santa Cruz).

A seguir, as membranas foram lavadas com TBS-T (3 lavagens) e incubadas com anticorpos secundários marcados com peroxidase: anti-IgG de coelho (1:300; BIO RAD) e anti-IgG de cabra (1:2000; SIGMA) por 1 hora. Após esse período as membranas foram novamente lavada com TBS-T (3 lavagens) e então incubadas com ECL (*Enhanced Chemiluminescent substrate*, BIO RAD, EUA) de acordo com especificações do fabricante. A detecção foi realizada utilizando o aparelho fotodocumentador Quemi-Doc (BIO RAD) e analisadas pelo software Image Lab (BIO RAD). Os resultados foram expressos como intensidade relativa entre as bandas das proteínas analisadas e a banda do controle de eletroforese (α -tubulina).

4.10 Análise estatística

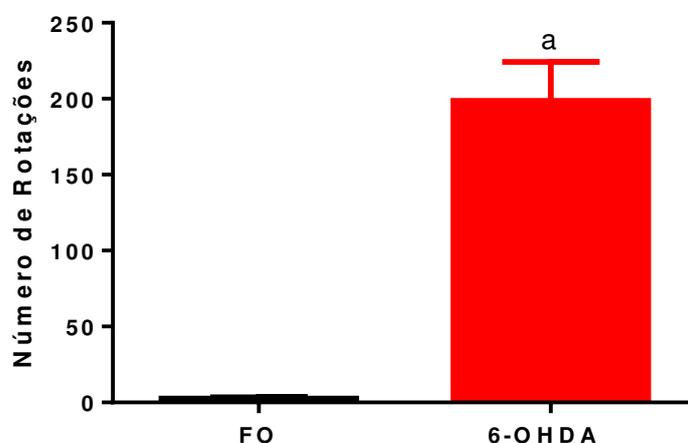
Os escores de AIMS foram avaliados através de testes não paramétricos, Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Para a comparação dentro do mesmo grupo foi utilizado o teste não paramétrico de medidas repetidas, teste de Friedman, seguido do teste de Dunn. Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney e os resultados foram expressos como mediana \pm Mínimo-Máximo. As análises imunohistológicas para TH, DAT e coloração por fluoro-jade C foram realizadas através de análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey e os valores expressos como média \pm erro padrão da média. As análises imunohistoquímicas para GFAP e CD11b avaliadas através do teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos e os resultados foram expressos como mediana \pm Mínimo-Máximo. A análise das células COX-2 positivas foi realizada através da ANOVA, seguida do teste de Tukey e os valores expressos como média \pm erro padrão da média. A análise das bandas de western-blot (D1, D2, pDARPP-32Thr34, IL-1 β) foi realizada através do teste de ANOVA, seguido do teste de Tukey e os valores expressos como média \pm erro padrão da média. O critério de significância utilizado em todo o estudo foi de $p < 0,05$. O programa computacional de estatística usado foi o GraphPad Prism® 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da rotação induzida pela apomorfina para seleção dos animais parkinsonianos

Os animais que receberam as injeções de 6-OHDA no corpo estriado apresentaram um aumento significativo do número de rotações induzidas pela administração i.p. de apomorfina (FO: $2,6 \pm 0,8$ rotações; 6-OHDA: $190,9 \pm 51,8$ rotações) (Figura 9).

Figura 9 – Número de rotações induzidas pela apomorfina em ratos parkinsonianos.



Os animais receberam a injeção intraestriatal de 6-OHDA ($18 \mu\text{g}/3 \mu\text{l}$) e após 14 dias foram tratados com apomorfina ($1,0 \text{ mg/kg}$ i.p.). Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. $p=0,0005$. ^avs FO (n=10).

5.2 Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre o desenvolvimento de ALO AIMs após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.

Os animais parkinsonianos que receberam o tratamento com L-DOPA apresentaram aumento significativo do número de movimentos involuntários anormais axiais, orolinguais e dos membros quando comparados com os animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com a L-DOPA após 7 dias de tratamento (PARK: 0,5 (0,0 - 8,0) escores, PARK + L-DOPA: 13,0 (4,0 - 40,0) escores) (Figura 10 A). Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e com o BBG na dose de 22,5 mg/kg apresentaram uma diminuição do número de escores de movimentos involuntários anormais, porém não foi estatisticamente significativa. O grupo tratado com a maior dose, 45 mg/kg, apresentou diminuição significativa do número de ALO AIMs (PARK + L-DOPA +BBG 22,5: 6,0 (2,0 - 26,0) escores, PARK + L-DOPA +BBG 45: 2,0 (0,0 - 7,0) escores) quando comparados com os animais parkinsonianos (Figura 10 A).

Após 14 dias de tratamento observamos que os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram aumento significativo do número de escores de movimentos involuntários anormais axiais, orolinguais e dos membros quando comparados com os animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com a L-DOPA (PARK: 0,5 (0,0 - 2,0) escores, PARK + L-DOPA: 14,0 (4,0 - 43,0) escores) (Figura 10 B). O tratamento com o BBG em ambas as doses, 22,3 e 45 mg/kg, causou uma diminuição significativa do número de escores de ALO AIMs (PARK + L-DOPA +BBG 22,5: 2,0 (0,0 - 5,0) escores, PARK + L-DOPA+BBG 45: 2,0 (0,0 - 5,0) escores) quando comparados com os animais parkinsonianos (Figura 10 B) demonstrando um efeito protetor do BBG contra a discinesia induzida por L-DOPA.

Após 21 dias de tratamento com L-DOPA observamos que os animais parkinsonianos apresentaram aumento significativo do número de escores de movimentos involuntários anormais axiais, orolinguais e dos membros quando comparados com os animais parkinsonianos que não receberam o tratamento com a L-DOPA (PARK: 1,0 (0,0 - 4,0) escores, PARK + L-DOPA: 16,0 (5,0 - 43,0) escores) e o tratamento com o BBG em ambas as doses, 22,5 e 45 mg/kg, foi capaz de diminuir significativamente o número de escores de de ALO AIMs (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: 2,0 (0,0 - 5,0) escores, PARK + L-DOPA +BBG 45: 1,0 (0,0 - 6,0) escores) quando comparados com os animais parkinsonianos (Figura 10 C).

O efeito do tratamento com L-DOPA na dose de 30 mg/kg foi avaliado através da comparação das médias de escores obtidos entre os dias 7, 14 e 21 de tratamento. O grupo parkinsoniano tratado com L-DOPA não apresentou aumento gradual significativo de ALO AIMS ao longo do tratamento de 21 dias, apresentando efeito máximo a partir do 7º dia de tratamento (PARK + L-DOPA: dia 7: 13,71±3,08 escores; dia 14: 16,36±2,69 escores; dia 21: 17,21±2,63 escores) (Figura 10 D). O BBG na dose de 22,5 mg/kg apresentou efeito anti-discinético a partir do 14º dia de tratamento (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: dia 7: 10,6±2,77 escores; dia 14: 4,1±1,4 escores; dia 21: 2,2±0,55 escores). Na dose de 45 mg/kg pudemos observar efeito máximo anti-discinético do BBG a partir do 7º dia de tratamento (PARK + L-DOPA + BBG 45: dia 7: 2,5±0,63 escores; dia 14: 2,0±0,49 escores; dia 21: 2,33±0,82 escores) (Figura 10 D).

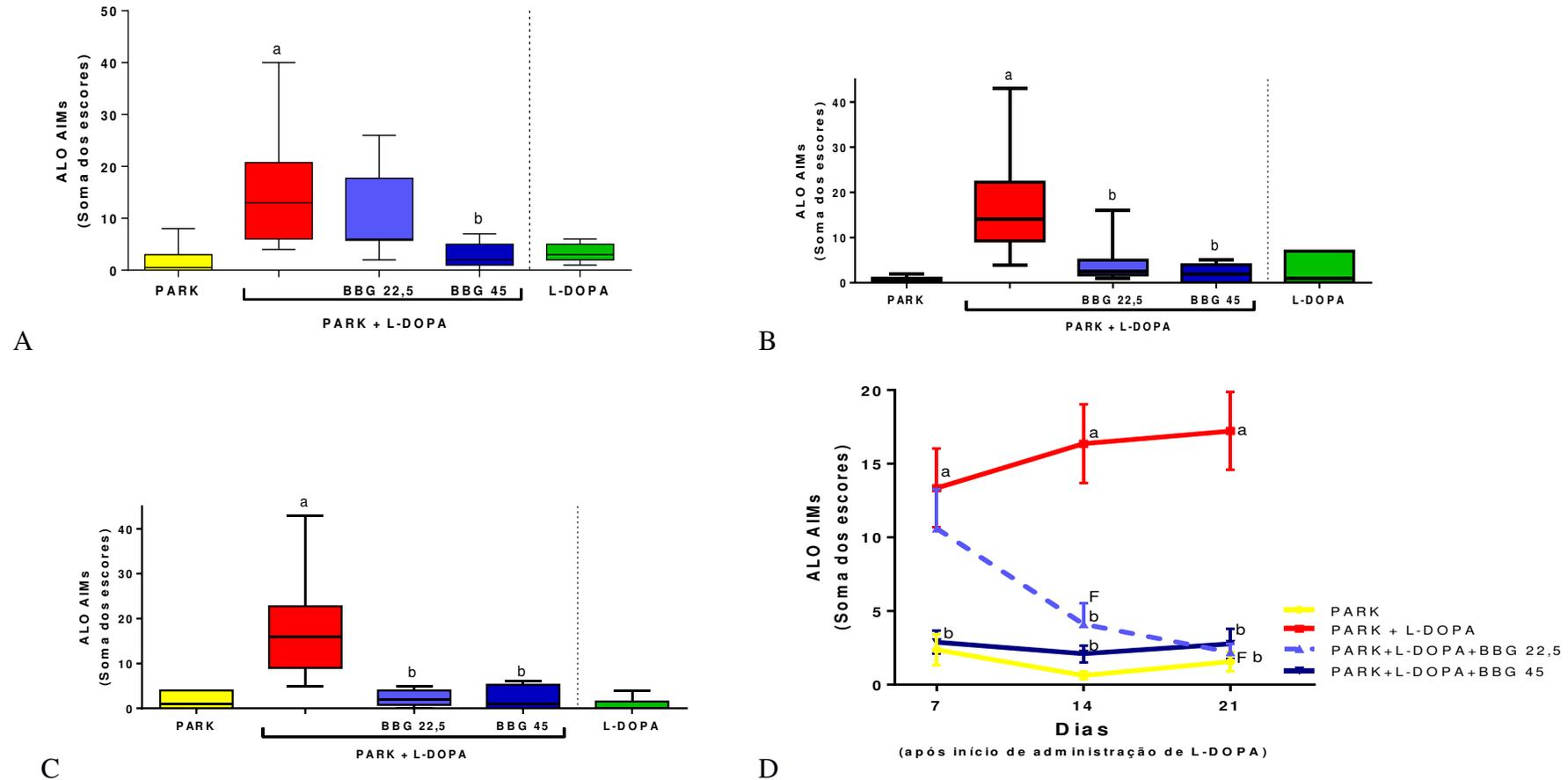
Não foram observadas alterações significativas entre os grupos falso-operados (Tabela 3). É válido salientar que os animais falso-operados tratados com L-DOPA não apresentaram aumento significativo do número de ALO AIMS (Tabela 3), o que demonstra que a L-DOPA por si só não é capaz de causar o desenvolvimento de movimentos involuntários anormais (Figura 10 A, B, C).

Tabela 3 - Escores de ALO AIMS dos grupos FO, FO+BBG 45 e FO+L-DOPA avaliados nos dias 7, 14 e 21 após a administração de L-DOPA.

Grupos	Dias		
	7	14	21
FO	2,0 (0,0 – 3,0) escores	1,0 (0,0 – 4,0) escores	0,5 (0,0 – 2,0) escores
FO+BBG 45	1,5 (1,0 – 2,0) escores	2,5 (1,0 – 3,0) escores	0,0 (0,0 – 3,0) escores
FO+L-DOPA	3,0 (1,0 – 6,0) escores	1,0 (0,0 – 7,0) escores	0,0 (0,0 – 4,0) escores

FO: falso-operado, FO+BBG 45: falso-operado tratado com BBG na dose de 45 mg/kg, FO+L-DOPA: falso-operado tratado com L-DOPA/Benserazida na dose de 30 mg/kg. Resultados expressos em mediana (Min-Max).

Figura 10 - Inibição do desenvolvimento de ALO AIMS pelo BBG após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.



Os animais foram tratados 7 (A), 14 (B) e 21 (C) dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e/ou com o BBG (22,5 e 4 mg/kg i.p.). Em (D) observamos a curva de tempo dos escores de AIMS. Valores expressos em mediana (Min-Max). Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA. Teste de Friedman para comparação dentro do mesmo grupo. ^Fvs dia 7 (n=10).

5.3 Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre o desenvolvimento de AIMs locomotores após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.

Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram aumento significativo de movimentos involuntários locomotores (PARK: 0,0 (0,0 - 1,0) escores, PARK + L-DOPA: 8,5 (7,0 - 17,0) escores). O tratamento com o BBG na dose de 45 mg/kg diminuiu significativamente o desenvolvimento dos AIMs locomotores (PARK + L-DOPA +BBG 22,5: 1,5 (0,0 – 10,0) escores, PARK + L-DOPA + BBG 45: 1,0 (0,0 – 4,0) escores) (Figura 11 A).

Após 14 dias de administração de L-DOPA os animais apresentaram aumento significativo do número de escores de AIMs locomotores em relação ao grupo parkinsoniano (PARK: 0,0 (0,0 - 1,0) escores, PARK + L-DOPA: 7,0 (4,0 - 17,0) escores) e o BBG diminuiu significativamente o desenvolvimento de AIMs locomotores em ambas as doses, 22,5 e 45 mg/kg (PARK + L-DOPA +BBG 22,5: 0,0 (0,0 – 2,0) escores, PARK + L-DOPA +BBG 45: 0,5 (0,0 – 2,0) escores) (Figura 11 B).

Após 21 dias de tratamento com L-DOPA o número de escores de AIMs locomotores nos animais parkinsonianos aumentou significativamente (PARK: 0,0 (0,0 - 0,0) escores, PARK + L-DOPA: 8,5 (4,0 - 17,0) escores) e o BBG diminuiu o desenvolvimento de AIMs locomotores em ambas as doses, 22,5 e 45 mg/kg (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: 0,0 (0,0 – 1,0) escores, PARK + L-DOPA + BBG 45: 0,0 (0,0 – 1,0) escores) (Figura 11 C).

O efeito crônico do tratamento com L-DOPA em relação ao desenvolvimento de AIMs locomotores foi avaliado através da comparação das médias de escores obtidos entre os dias 7, 14 e 21 de tratamento (PARK: dia 7: $0,25 \pm 0,16$ escores; dia 14: $0,13 \pm 0,13$ escores; dia 21: $0,0 \pm 0,0$ escores) (Figura 11 D). A L-DOPA apresentou efeito máximo em induzir AIMs locomotores pois não foi observado diferenças significativas na comparação entre os dias de avaliação de AIMs no grupo parkinsoniano tratado com L-DOPA (PARK + L-DOPA: dia 7: $9,83 \pm 1,6$ escores; dia 14: $8,67 \pm 2,02$ escores; dia 21: $9,0 \pm 1,8$ escores). Observamos diminuição significativa de AIMs locomotores do 21º dia de tratamento com BBG na dose de 45 mg/kg em relação ao 7º dia, apresentando efeito máximo no 21º dia (PARK + L-DOPA + BBG 45: dia 7: $2,37 \pm 0,65$ escores; dia 14: $0,65 \pm 0,26$ escores; dia 21: $0,43 \pm 0,2$ escores). Na dose de 22,5 mg/kg observamos efeito máximo a partir do 14º dia (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: dia 7: $2,88 \pm 1,28$ escores; dia 14: $0,5 \pm 0,27$ escores; dia 21: $0,29 \pm 0,18$ escores) (Figura 11 D).

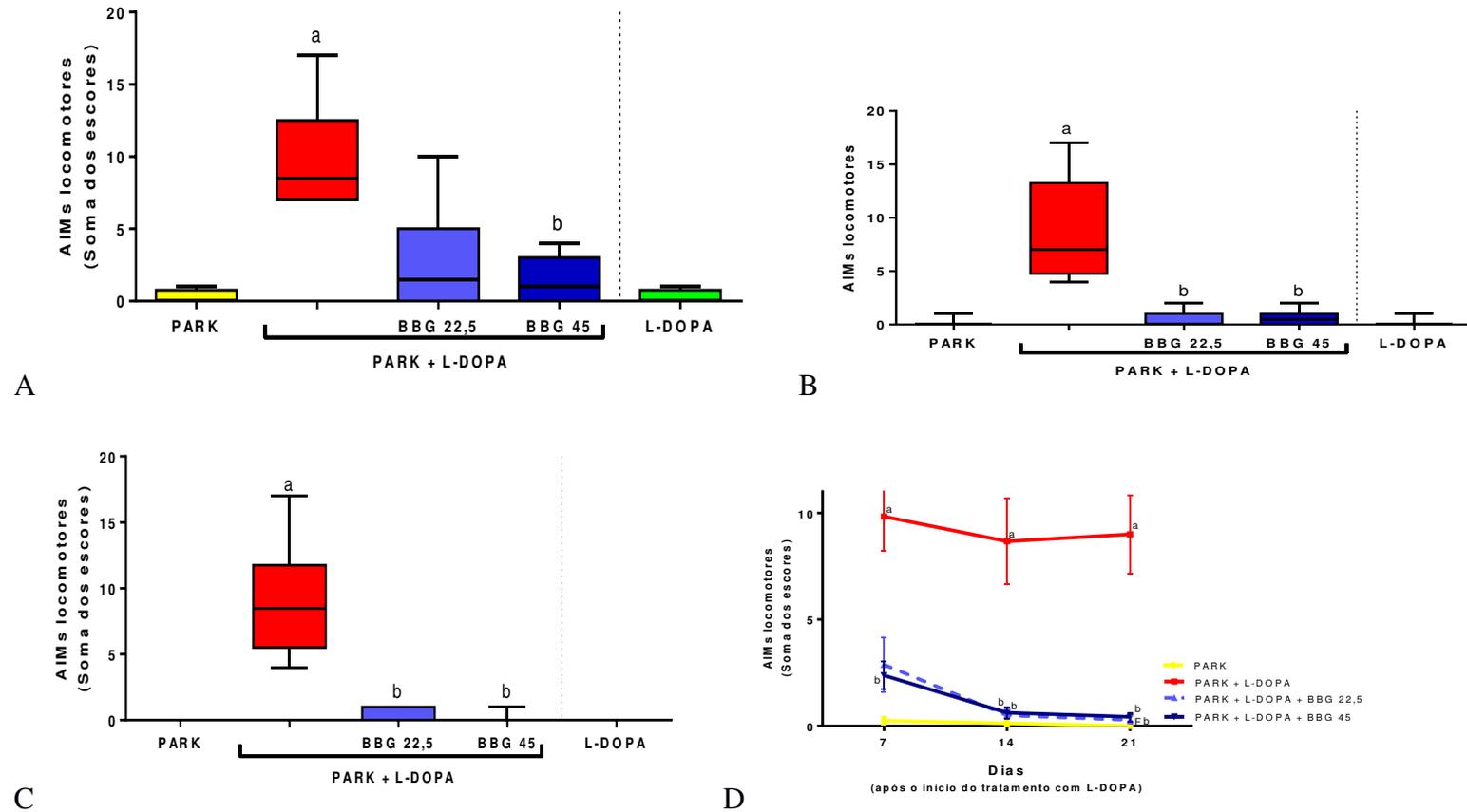
Não foram encontradas alterações nos grupos falso-operados (Tabela 4). O grupo falso-operado tratado com L-DOPA (30 mg/kg) não apresentou aumento dos AIMs locomotores após 7, 14 e 21 dias de tratamento, mostrando que a L-DOPA sozinha, sem a degeneração dopaminérgica, não é capaz de induzir a discinesia (Figura 11 A, B, C) (Tabela 4).

Tabela 4 - Escores de AIMs locomotores dos grupos FO, FO+BBG 45 e FO+L-DOPA avaliados nos dias 7, 14 e 21 após a administração de L-DOPA.

Grupos	Dias		
	7	14	21
FO	0,0 (0,0 – 1,0) escores	0,0 (0,0 – 1,0) escores	0,0 (0,0 – 1,0) escores
FO+BBG 45	0,0 (0,0 – 1,0) escores	0,0 (0,0 – 0,0) escores	0,0 (0,0 – 2,0) escores
FO+L-DOPA	0,0 (0,0 – 1,0) escores	0,0 (0,0 – 1,0) escores	0,0 (0,0 – 0,0) escores

FO: falso-operado, FO+BBG 45: falso-operado tratado com BBG na dose de 45 mg/kg, FO+L-DOPA: falso-operado tratado com L-DOPA/Benserazida na dose de 30 mg/kg. Resultados expressos em mediana (Min-Max).

Figura 11 – Inibição do desenvolvimento de AIMs locomotores pelo BBG após 7, 14 e 21 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos.



Os animais foram tratados 7 (A), 14 (B) e 21 (C) com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com o BBG (22,5 e 45 mg/kg). Valores expressos em mediana (Min-Max).

Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. ^avsPARK ($p < 0,0001$), ^bvsPARK + L-DOPA (BBG 22,5 $p = 0,0065$; BBG 45 $p = 0,0005$) ($n = 10$).

5.4 Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre o desenvolvimento de AIMs no 7º, 14º e 21º dia após o início da administração de L-DOPA (30 mg/kg) em animais parkinsonianos: curva de tempo após uma dose de L-DOPA.

No 7º dia a L-DOPA induziu o aumento significativo de AIMs totais a partir de 40 minutos após sua administração aos animais parkinsonianos (PARK + L-DOPA: 20 min: $1,29 \pm 0,27$ escores; 40 min: $3,0 \pm 0,63$ escores; 60 min: $2,67 \pm 0,38$ escores; 80 min: $3,0 \pm 0,49$ escores; 100 min: $3,07 \pm 0,69$ escores; 120 min: $3,0 \pm 0,71$ escores). O BBG apresentou efeito anti-discinético na dose de 45 mg/kg a partir de 80 minutos após a administração de L-DOPA (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: 20 min: $1,6 \pm 0,54$ escores; 40 min: $2,6 \pm 0,89$ escores; 60 min: $2,4 \pm 0,72$ escores; 80 min: $2,7 \pm 0,62$ escores; 100 min: $2,2 \pm 0,61$ escores; 120 min: $2,1 \pm 0,6$ escores; PARK + L-DOPA + BBG 45: 20 min: $1,0 \pm 0,33$ escores; 40 min: $2,0 \pm 0,6$ escores; 60 min: $2,0 \pm 0,55$ escores; 80 min: $1,22 \pm 0,59$ escores; 100 min: $1,1 \pm 0,39$ escores; 120 min: $0,89 \pm 0,35$ escores) (Figura 12 A).

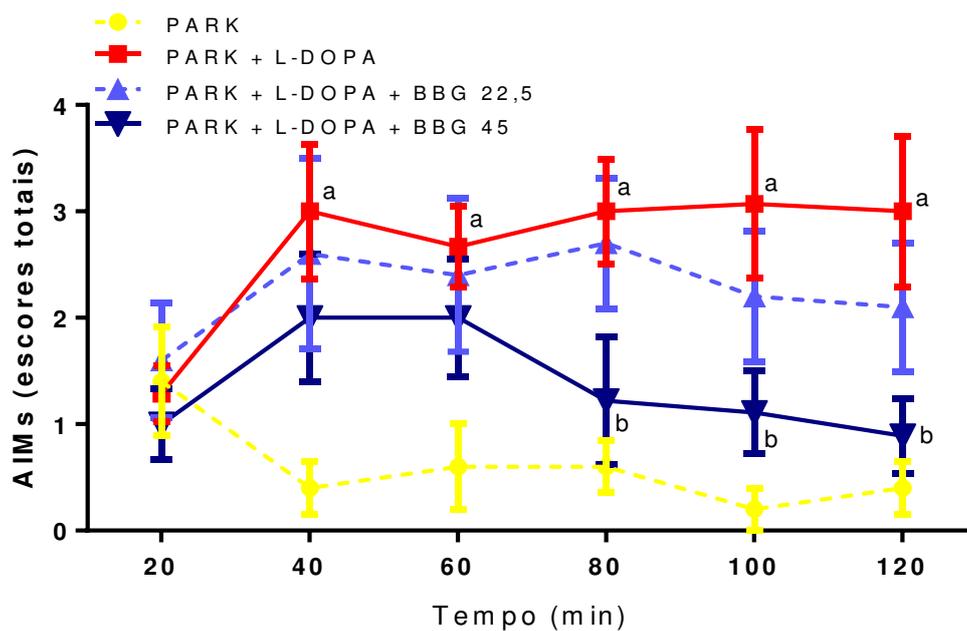
No 14º dia de tratamento, podemos observar que a L-DOPA induz o aumento significativo de AIMs totais a partir de 20 minutos após a administração (PARK + L-DOPA: 20 min: $2,75 \pm 0,88$ escores; 40 min: $2,63 \pm 0,46$ escores; 60 min: $2,75 \pm 0,92$ escores; 80 min: $3,38 \pm 0,75$ escores; 100 min: $4,125 \pm 0,92$ escores; 120 min: $3,38 \pm 0,9$ escores). O efeito anti-discinético do BBG se iniciou a partir de 40 minutos após a administração de L-DOPA em ambas as doses (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: 20 min: $1,17 \pm 0,48$ escores; 40 min: $0,33 \pm 0,21$ escores; 60 min: $0,17 \pm 0,17$ escores; 80 min: $0,5 \pm 0,22$ escores; 100 min: $0,5 \pm 0,22$ escores; 120 min: $0,33 \pm 0,21$ escores; PARK + L-DOPA + BBG 45: 20 min: $0,89 \pm 0,44$ escores; 40 min: $0,38 \pm 0,26$ escores; 60 min: $0,5 \pm 0,27$ escores; 80 min: $0,16 \pm 0,16$ escores; 100 min: $0,5 \pm 0,32$ escores; 120 min: $0,0 \pm 0,0$ escores) (Figura 12 B).

No 21º dia, podemos observar que a L-DOPA induz o aumento significativo de AIMs totais a partir de 20 minutos após a administração (PARK + L-DOPA: 20 min: $2,14 \pm 0,63$ escores; 40 min: $3,44 \pm 0,88$ escores; 60 min: $2,67 \pm 0,86$ escores; 80 min: $3,11 \pm 0,89$ escores; 100 min: $3,44 \pm 0,88$ escores; 120 min: $3,22 \pm 0,77$ escores) (Figura 19). O BBG inibe o desenvolvimento de AIMs a partir de 20 minutos após a administração de L-DOPA, em ambas as doses (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: 20 min: $0,5 \pm 0,22$ escores; 40 min: $0,83 \pm 0,30$ escores; 60 min: $0,5 \pm 0,22$ escores; 80 min: $0,16 \pm 0,16$ escores; 100 min: $0,33 \pm 0,33$ escores; 120 min: $0,16 \pm 0,16$ escores; PARK + L-DOPA + BBG 45: 20 min: $0,33 \pm 0,21$ escores; 40

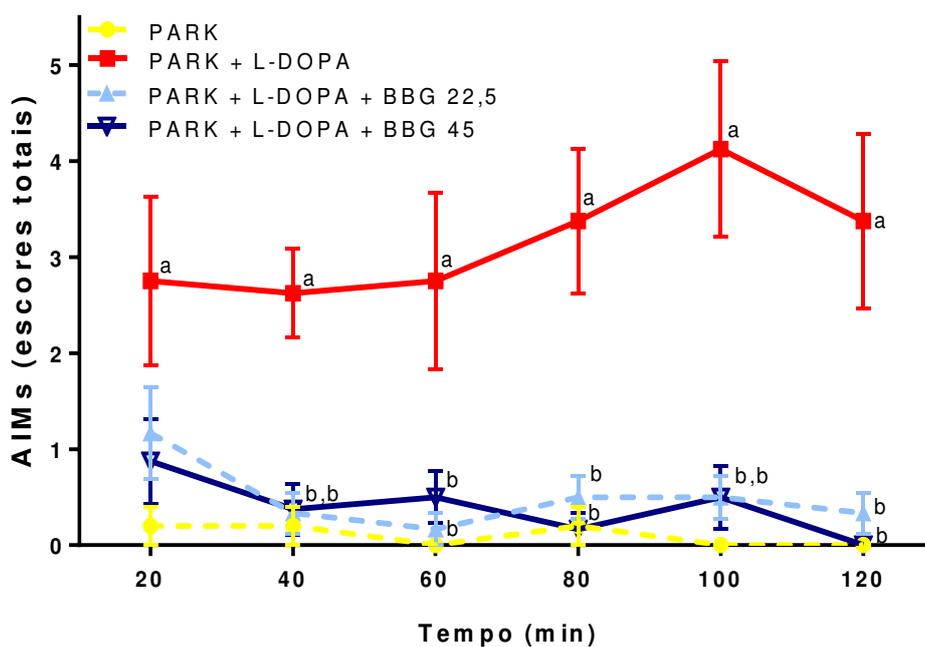
min: $0,34\pm0,22$ escores; 60 min: $0,33\pm0,21$ escores; 80 min: $0,5\pm0,34$ escores; 100 min: $0,0\pm0,0$ escores; 120 min: $0,0\pm0,0$ escores) (Figura 12 C).

Figura 12 - Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre os AIMs totais (ALO e locomotores) após a administração de uma dose de L-DOPA (30 mg/kg) no 7º, 14º e 21º dia após o início do tratamento.

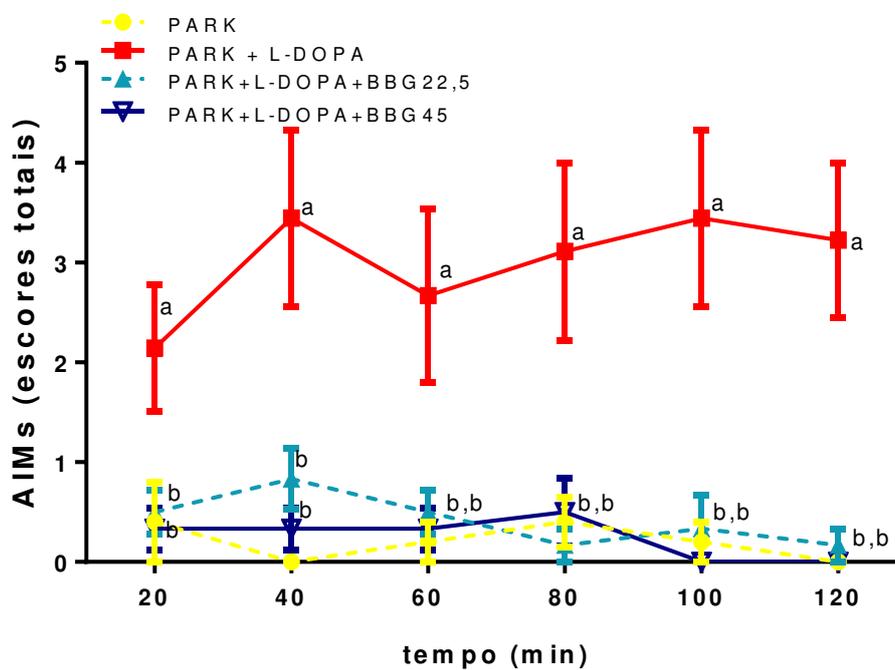
A



B



C

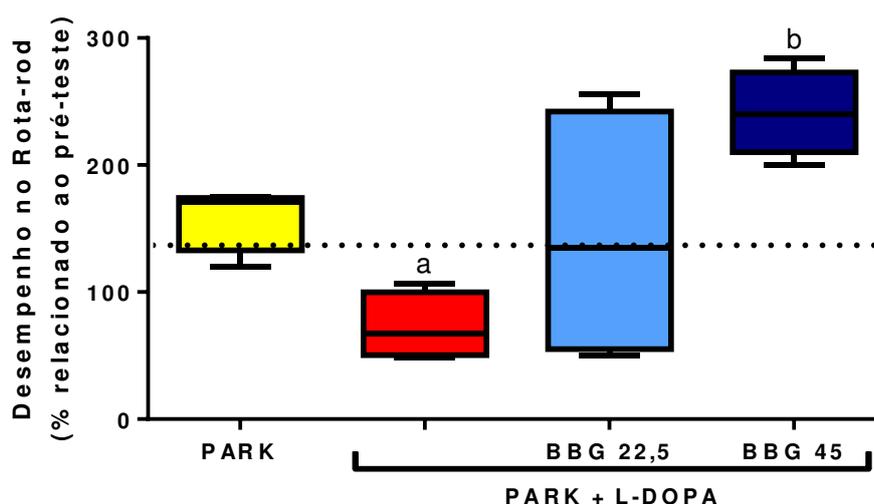


Os animais foram tratados com o BBG (22,5 e 45 mg/kg i.p.) 30 minutos antes da administração de L-DOPA (30 mg/kg v.o.) no 7º (A), 14º (B) e 21º (C) dia após o início do tratamento com L-DOPA. Os AIMs foram avaliados 20 minutos após a administração de L-DOPA. Valores expressos em média±EPM. Teste de Mann-Whitney para comparação entre os grupos.^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA. $p < 0,05$. (n=10).

5.5 Efeito do BBG (22,5 e 45 mg/kg) sobre a coordenação motora de ratos parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA (30 mg/kg).

O desempenho dos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA no rotarod diminuiu significativamente (PARK: 171,4 (120,0–175,0) % em relação a média, PARK + L-DOPA: 67,4 (48,9 - 106,6) % em relação a média), demonstrando que houve perda de coordenação motora. O BBG melhorou o desempenho de coordenação motora na dose de 45 mg/kg, mas não na dose de 22,5 mg/kg (PARK + L-DOPA + BBG 22,5: 135,0 (50,0 – 256,0) % em relação a média, PARK + L-DOPA + BBG 45: 240,0 (200,3 – 284,0) % em relação a média) (Figura 13).

Figura 13 - Desempenho de coordenação motora de animais hemi-parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA

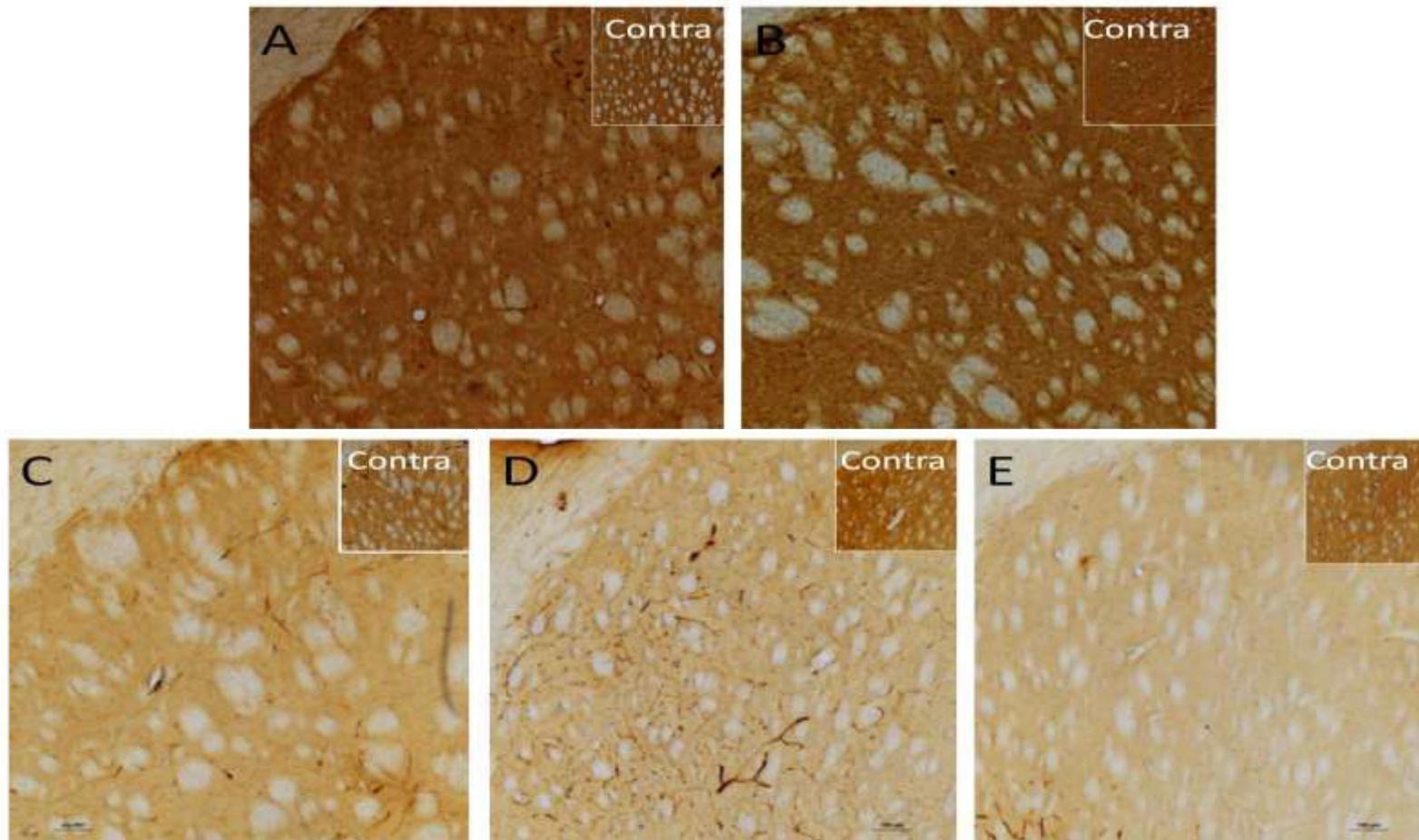


Resultados expressos em % da média da latência de 1 e 2 h relacionada ao pré-teste. A linha tracejada representa a mediana do grupo FO. Valores expressos em mediana (MIN – MAX). Teste de Mann-Whitney para comparação entre dois grupos. ^avs PARK ($p < 0,0001$), ^bvs PARK + L-DOPA ($p = 0,0055$) ($n = 10$).

5.6 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a morte neuronal avaliada através da imunomarcção por TH no mesencéfalo e no corpo estriado de ratos discinéticos hemi-parkinsonianos.

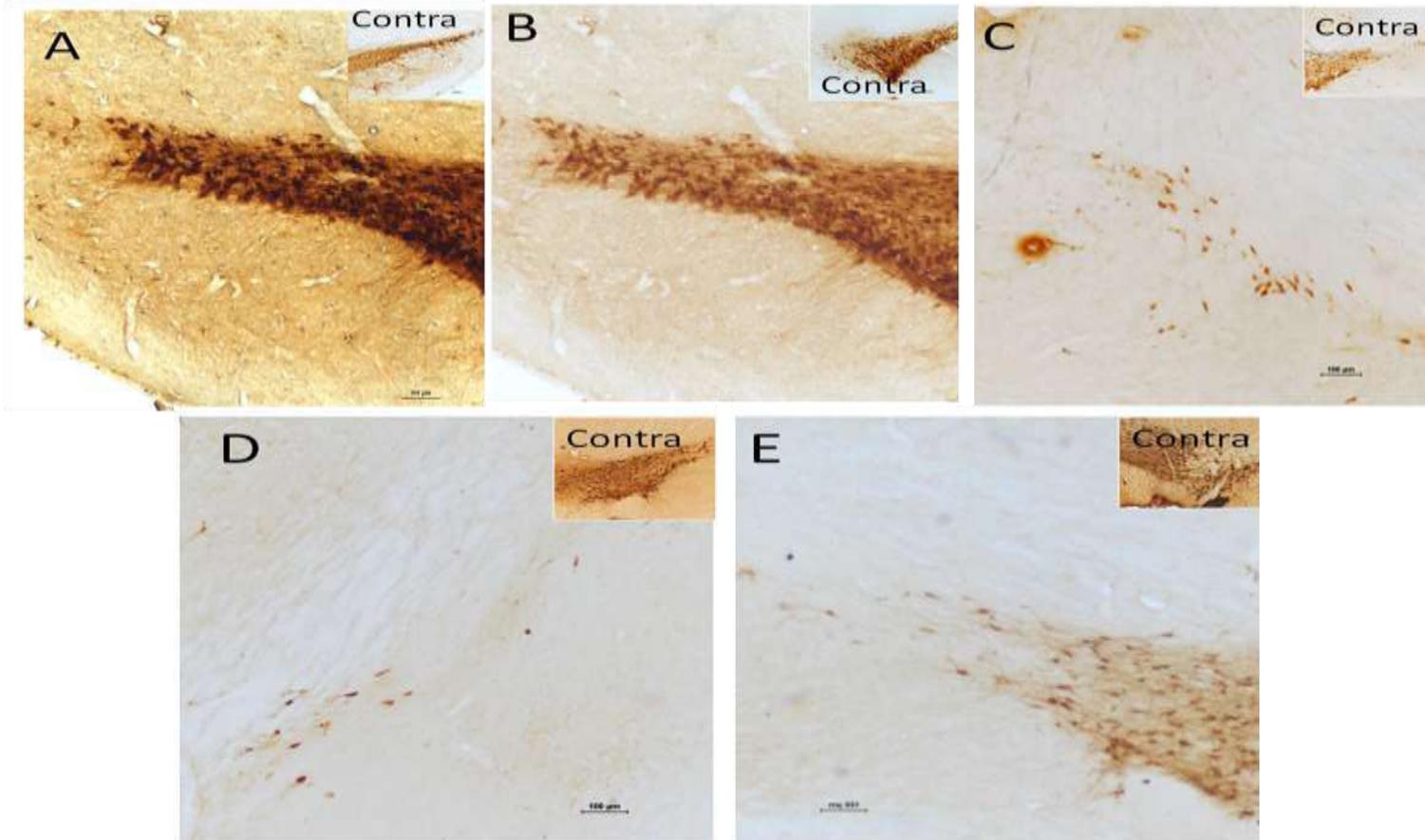
A morte de neurônios dopaminérgicos foi observada nos grupos de animais parkinsonianos no corpo estriado (Densidade óptica: Corpo estriado: FO: $100,0 \pm 12,9$; FO + BBG 45: $89,94 \pm 4,21$; PARK: $17,44 \pm 2,83$) (Figuras 14 e 16 A) e na substância negra (Densidade óptica: Mesencéfalo: FO: $100,0 \pm 5,9$; FO + BBG 45: $72,6 \pm 13,9$; PARK: $28,67 \pm 3,87$) (Figuras 15 e 16 B). Não foram observadas recuperação da morte neuronal nos grupos tratados com L-DOPA e/ou com o BBG (Densidade óptica: Mesencéfalo: PARK + L-DOPA: $30,71 \pm 1,73$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $30,6 \pm 2,9$; Corpo estriado: PARK + L-DOPA: $29,55 \pm 4,2$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $20,27 \pm 2,9$) (Figuras 14, 15 e 16 A e B).

Figura 14 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcção para TH em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadrado no canto superior direito representa o lado contralateral a lesão (aumento de 40 x).

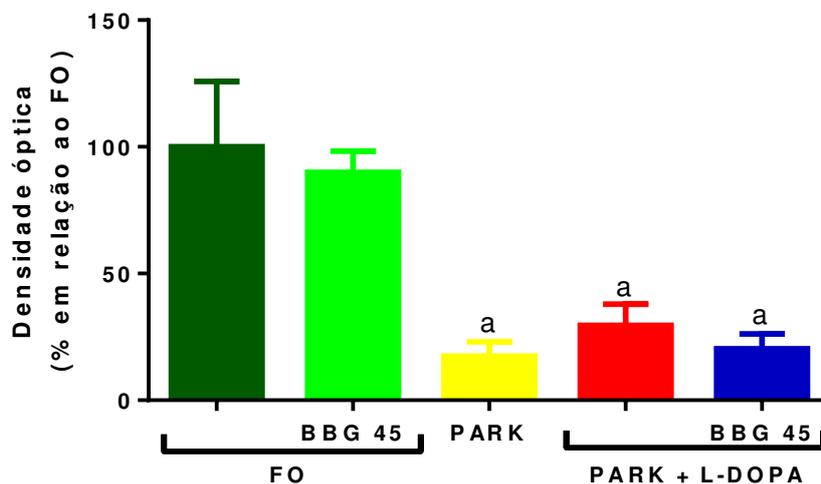
Figura 15 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a morte neuronal avaliada através de imunomarcção para TH no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



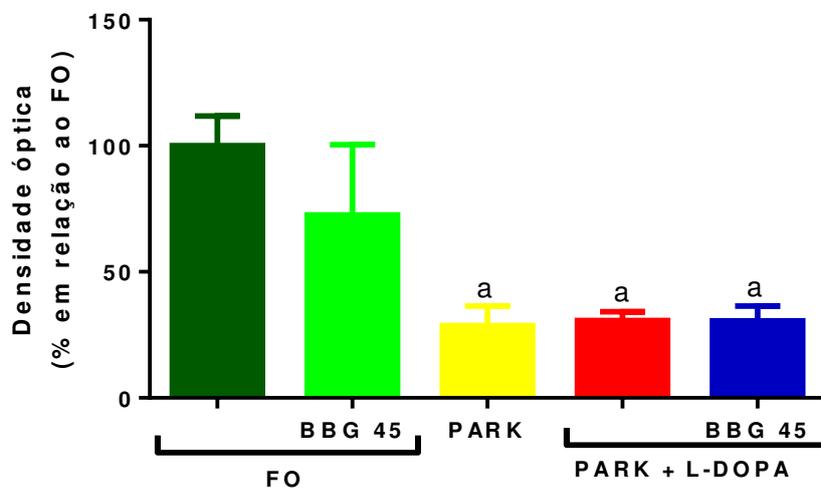
Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcção para TH em seções coronais do mesencéfalo (substância negra) dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadrado no canto superior direito representa o lado contralateral a lesão (aumento de 40 x).

Figura 16 – Imunomarcção para TH no corpo estriado e mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e do BBG em animais parkinsonianos.

A



B

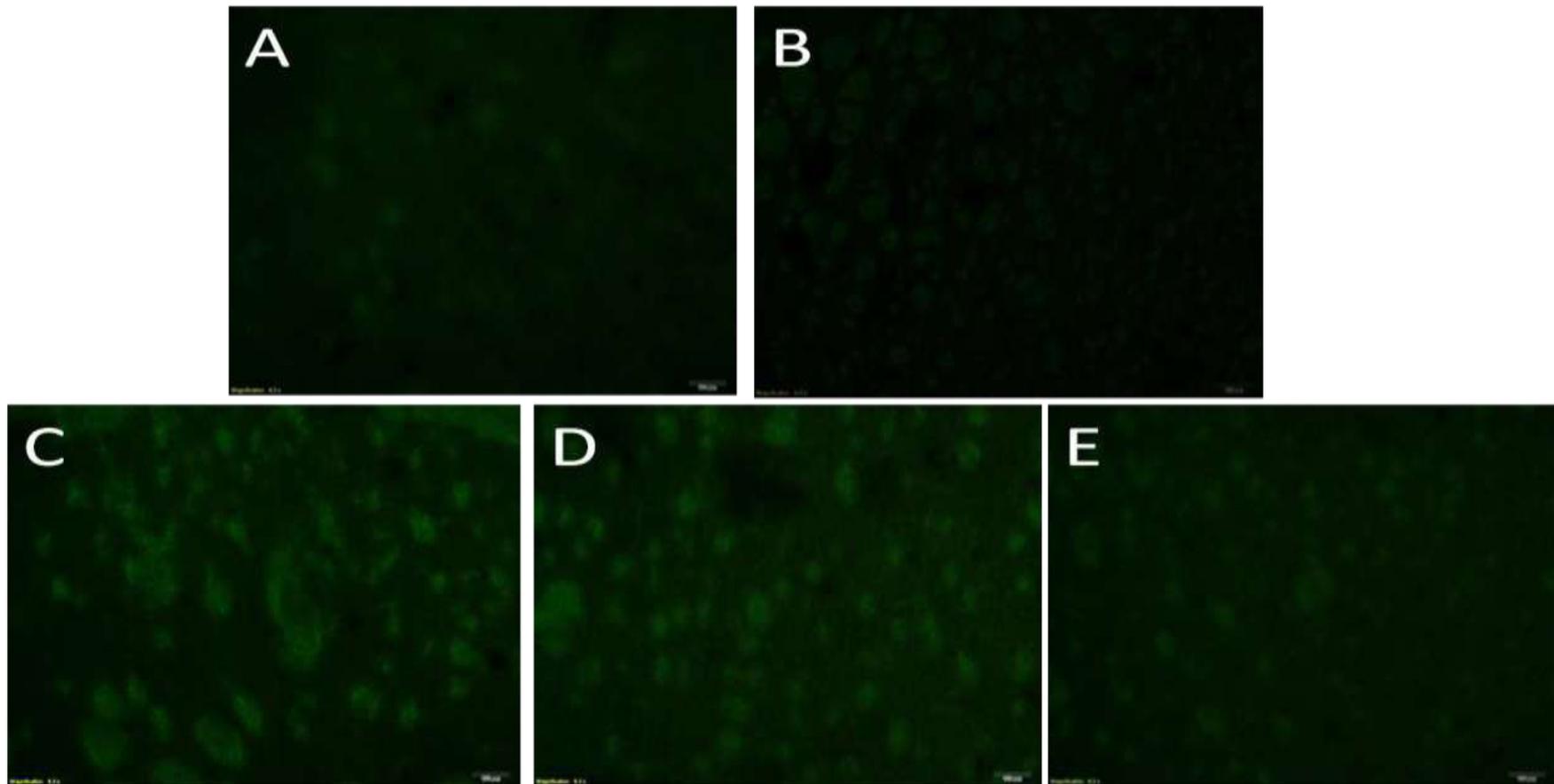


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) está representada a quantificação da imunomarcção para TH no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. Teste de Mann-Whitney. ^avs FO ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.7 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a degeneração neuronal avaliada através da coloração por fluoro-jade C no mesencéfalo e corpo estriado de ratos discinéticos hemiparkinsonianos.

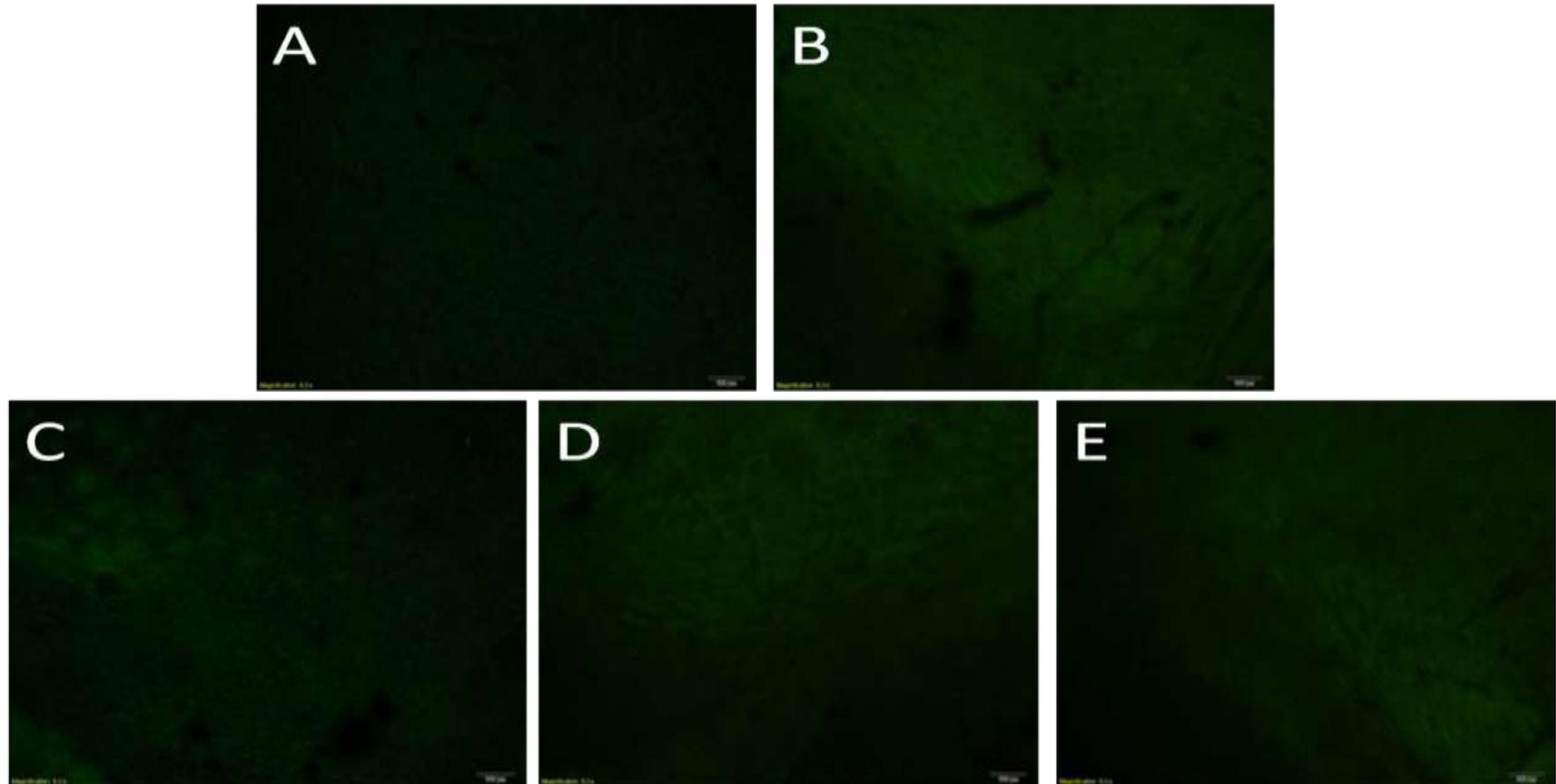
Não foi observada degeneração neuronal no corpo estriado nos animais parkinsonianos (Intensidade de fluorescência: Corpo estriado: FO: $21,23 \pm 1,33$; FO + BBG 45: $25,33 \pm 1,89$; PARK: $18,1 \pm 2,14$) (Figuras 17 e 19 A), bem como mesencéfalo (Intensidade de fluorescência: Mesencéfalo: FO: $31,94 \pm 1,84$; FO + BBG 45: $23,84 \pm 3,34$; PARK: $27,61 \pm 1,74$) (Figuras 18 e 19 B) em relação ao grupo falso-operado. Também não foram observadas alterações nos grupos tratados com L-DOPA e com o BBG (Intensidade de fluorescência: Mesencéfalo: PARK + L-DOPA: $26,86 \pm 2,71$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $28,78 \pm 2,33$; Corpo estriado: PARK + L-DOPA: $19,04 \pm 1,67$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $21,98 \pm 1,65$) (Figuras 17, 18, 19 A e B).

Figura 17 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluoro-jade C no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 100 x) representativas da coloração por fluoro-jade C em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E).

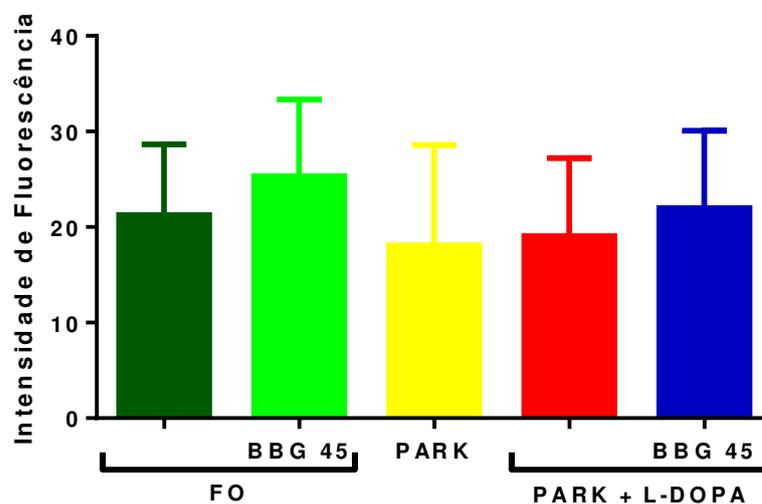
Figura 18 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a degeneração neuronal avaliada através de coloração por fluoro-jade C no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



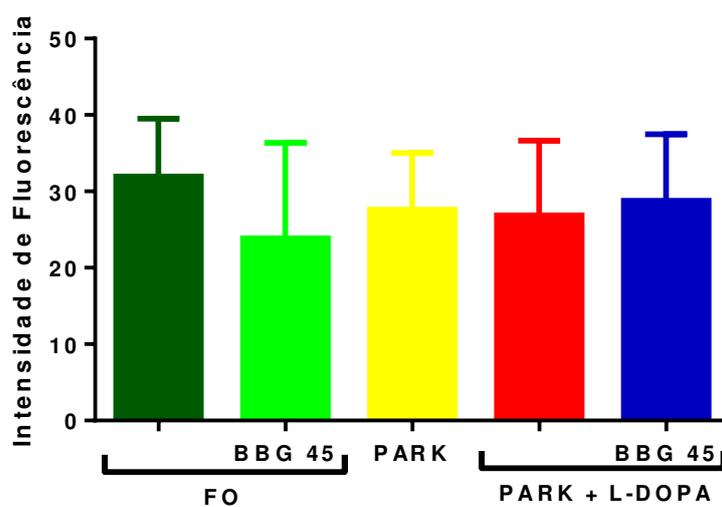
Microfotografias (aumento de 100 x) representativas da coloração por fluoro-jade C em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E).

Figura 19 – Coloração por fluoro-jade C no corpo estriado e mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e BBG em animais parkinsonianos.

A



B

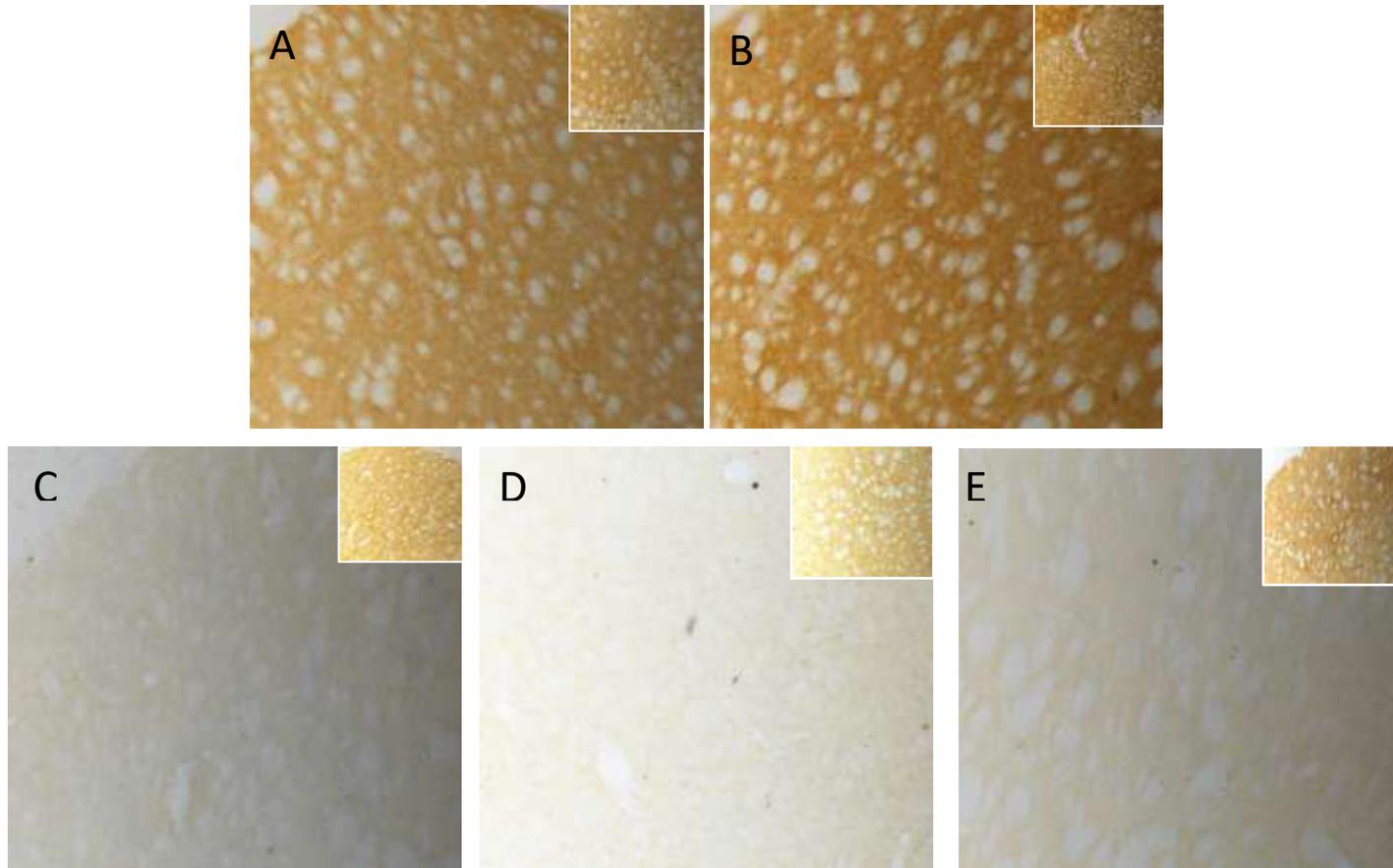


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) está representada a quantificação da intensidade de fluorescência no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. $p < 0,05$. (n=4).

5.8 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a imunomarcação para DAT no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

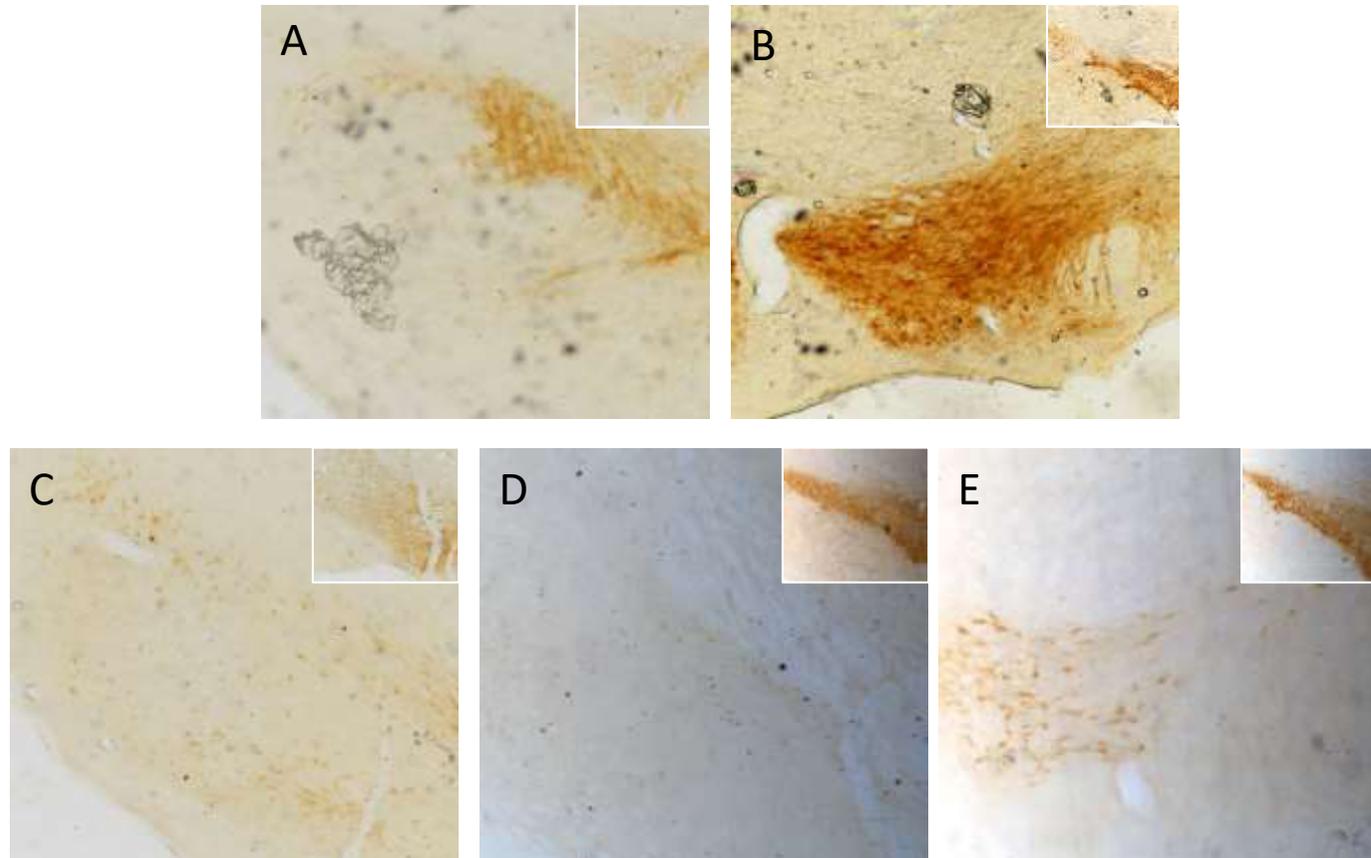
Os parkinsonianos apresentaram diminui o significativa da imunomarcação do DAT no corpo estriado (Densidade  ptica: FO: $100,0 \pm 7,1$; PARK: $11,08 \pm 3,68$) (Figuras 20 e 22 A) e no mesencéfalo (Densidade  ptica: FO: $63,12 \pm 4,8$; PARK: $21,01 \pm 8,1$) (Figuras 21 e 22 B). O tratamento crônico com a L-DOPA não reverteu   perda dos níveis de transportadores, demonstrando o mesmo nível de perda de DAT que os animais lesionados pela 6-OHDA (Densidade  ptica: Mesencéfalo: PARK + L-DOPA: $23,71 \pm 1,68$; Corpo estriado: PARK + L-DOPA: $19,31 \pm 9,4$). Enquanto que o tratamento com o BBG foi capaz de aumentar significativamente a imunomarcação para DAT no mesencéfalo (Densidade  ptica: FO + BBG 45: $79,29 \pm 12,94$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $46,94 \pm 6,19$) (Figuras 29 e 31), mas não no corpo estriado (Densidade  ptica: FO + BBG 45: $98,83 \pm 18,06$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $26,44 \pm 11,83$) (Figuras 20, 21 e 22, A e B).

Figura 20 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcação para DAT no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcação para DAT em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadrado no canto superior direito representa o lado contralateral a lesão (aumento de 40 x).

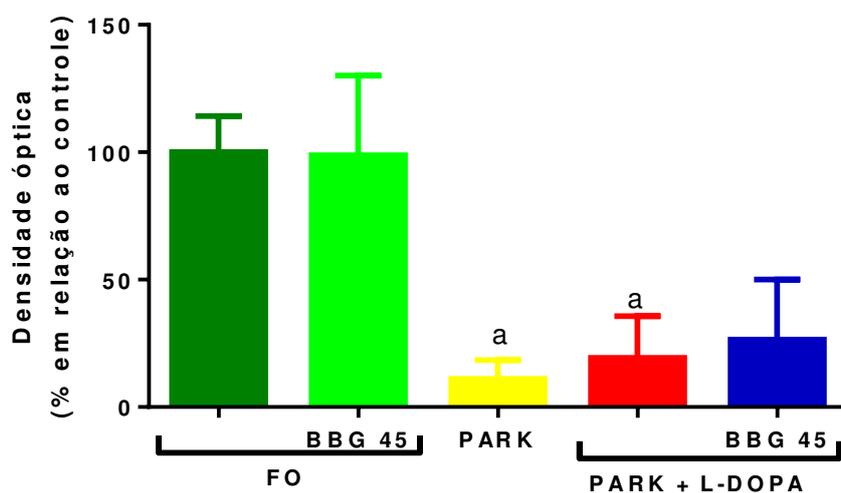
Figura 21 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcção para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



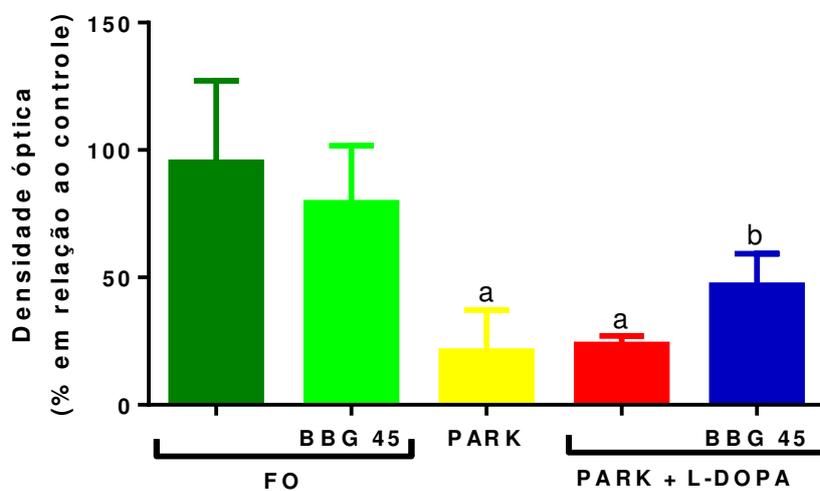
Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcção para DAT em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadrado no canto superior direito representa o lado contralateral a lesão (aumento de 40 x).

Figura 22 – Imunomarcção para DAT no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e BBG em animais parkinsonianos.

A



B



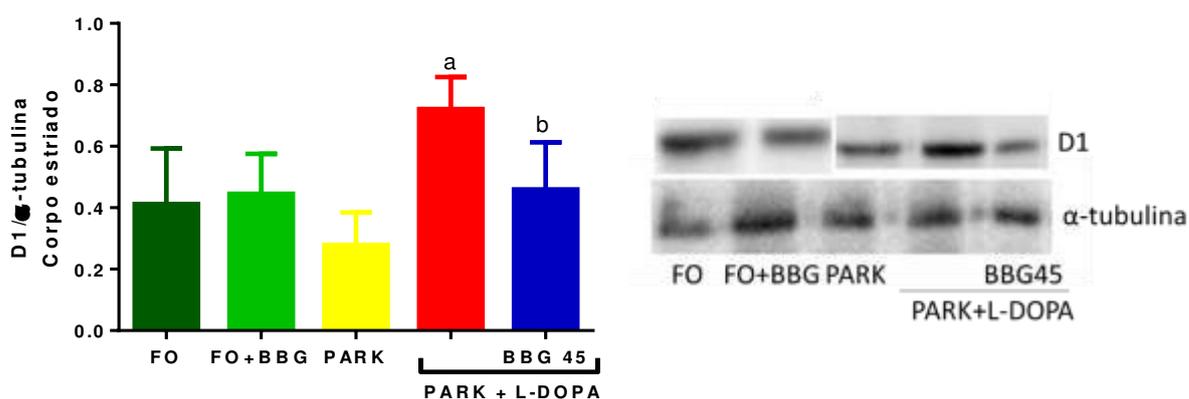
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação da imunomarcção para DAT no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs FO, ^bvs PARK + L-DOPA. ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.9 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre receptor dopaminérgico D1 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.

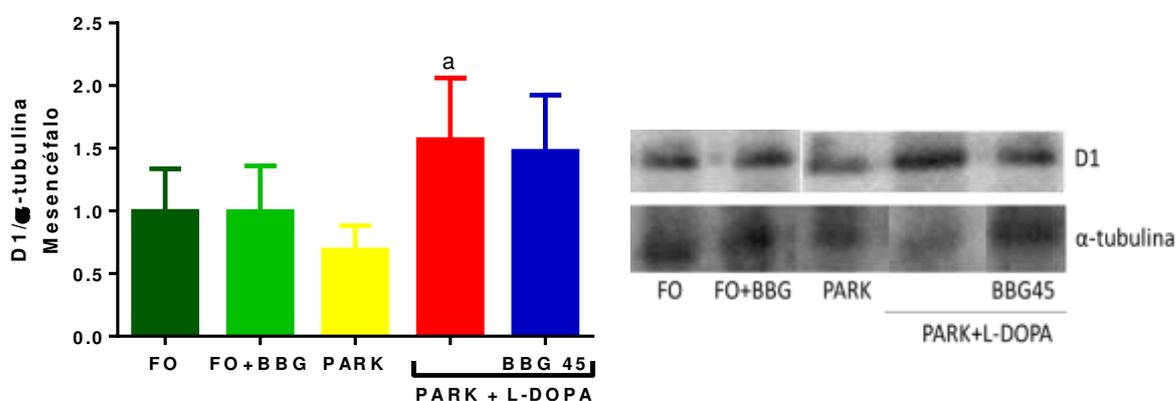
Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram aumento significativo da expressão do receptor D1 no corpo estriado (D1/tubulina: FO: $0,41 \pm 0,10$; FO+BBG: $0,44 \pm 0,07$; PARK: $0,28 \pm 0,05$; PARK + L-DOPA: $0,72 \pm 0,05$) (Figura 23 A) e no mesencéfalo (D1/tubulina: FO: $0,99 \pm 0,19$; FO+BBG: $0,99 \pm 0,2$; PARK: $0,69 \pm 0,09$; PARK + L-DOPA: $1,57 \pm 0,2$) em relação aos animais parkinsonianos (Figura 23 B). O tratamento com o BBG na dose de 45 mg/kg diminuiu a expressão de receptor D1 no corpo estriado (D1/tubulina: PARK + L-DOPA + BBG 45: $0,46 \pm 0,08$) (Figura 23 A), mas não no mesencéfalo (D1/tubulina: PARK + L-DOPA + BBG 45: $1,47 \pm 0,22$) (Figura 23 B).

Figura 23 – Expressão do receptor D1 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

A



B



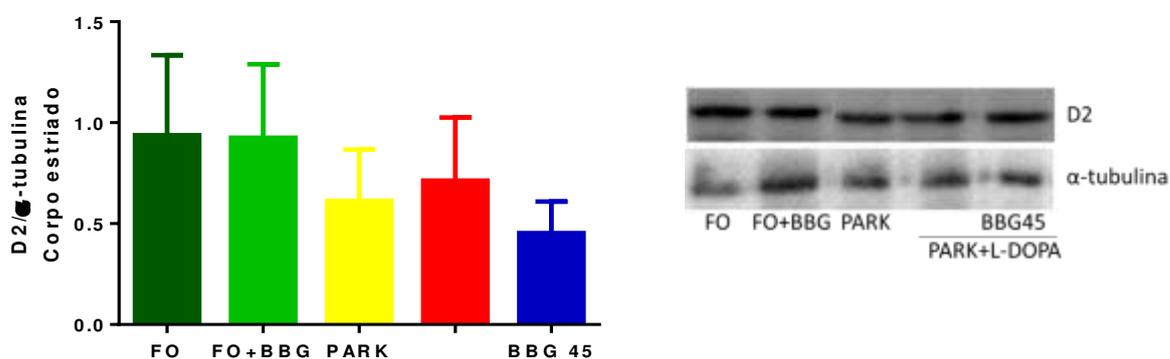
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação das bandas de western-blot no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.10 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre receptor dopaminérgico D2 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.

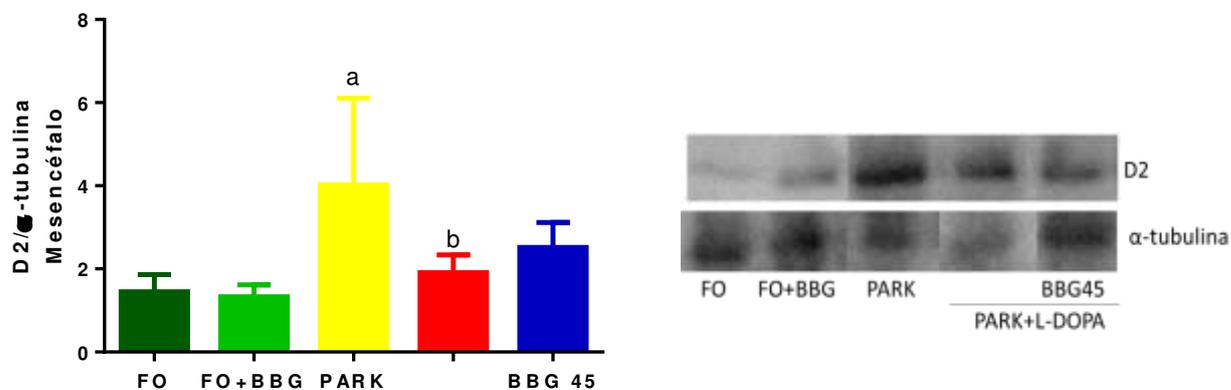
Não foram observadas alterações significativas no corpo estriado (D2/tubulina: FO: $0,93 \pm 0,19$; FO+BBG: $0,92 \pm 0,18$; PARK: $0,61 \pm 0,11$; PARK + L-DOPA: $0,71 \pm 0,15$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $0,45 \pm 0,06$) (Figura 24 A). Porém no mesencéfalo, os animais parkinsonianos apresentaram aumento significativo da expressão do receptor D2 em relação aos animais falso-operados (D2/tubulina: FO: $1,45 \pm 0,2$; FO+BBG: $1,32 \pm 0,14$; PARK: $4,01 \pm 1,0$) e os parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram diminuição significativa (D2/tubulina: PARK + L-DOPA: $1,9 \pm 0,21$). O tratamento com o BBG na dose de 45 mg/kg não foi capaz de reverter essa alteração (D2/tubulina: PARK + L-DOPA + BBG 45: $2,5 \pm 0,26$) (Figura 24 B).

Figura 24 – Expressão do receptor D2 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

A



B



Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação das bandas de western-blot no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média ± EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.11 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre pDARPP-32Thr34 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.

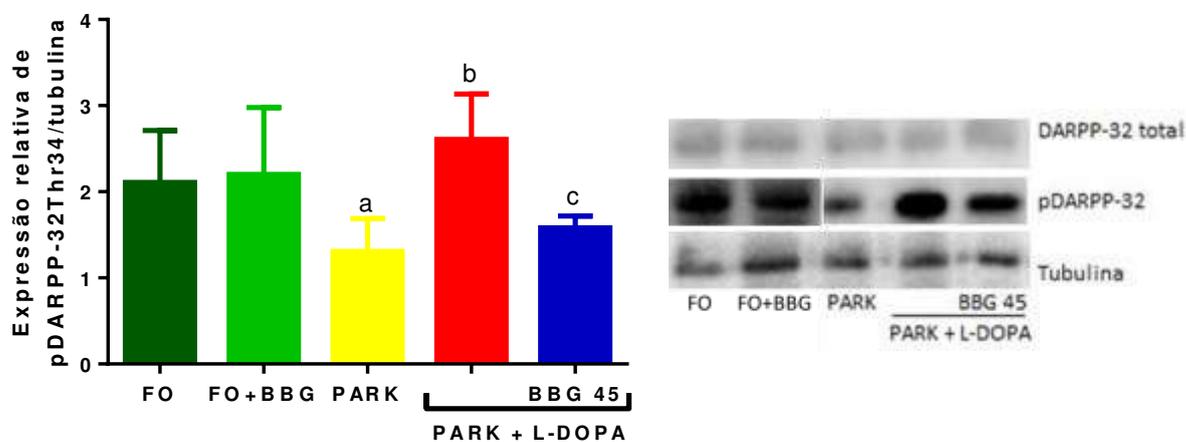
Os animais parkinsonianos apresentaram diminuição da expressão relativa de pDARPP-32Thr34 no corpo estriado em relação ao falso-operado (pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total: FO: $2,1 \pm 0,34$; FO+BBG: $2,2 \pm 0,44$; PARK: $1,3 \pm 0,17$) e os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram aumento significativo no corpo estriado em relação aos animais parkinsonianos (pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total: PARK + L-DOPA: $2,6 \pm 0,3$) (Figura 25 A).

No mesencéfalo não foi observado diminuição significativa da expressão relativa de pDARPP-32Thr34 nos animais parkinsonianos em relação aos animais falso-operados (pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total: FO: $1,3 \pm 0,03$; FO+BBG: $1,2 \pm 0,04$; PARK: $0,9 \pm 0,31$), porém foi observado aumento significativo da expressão relativa de pDARPP-32Thr34 nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA (pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total: PARK + L-DOPA: $1,5 \pm 0,18$) (Figura 25 B).

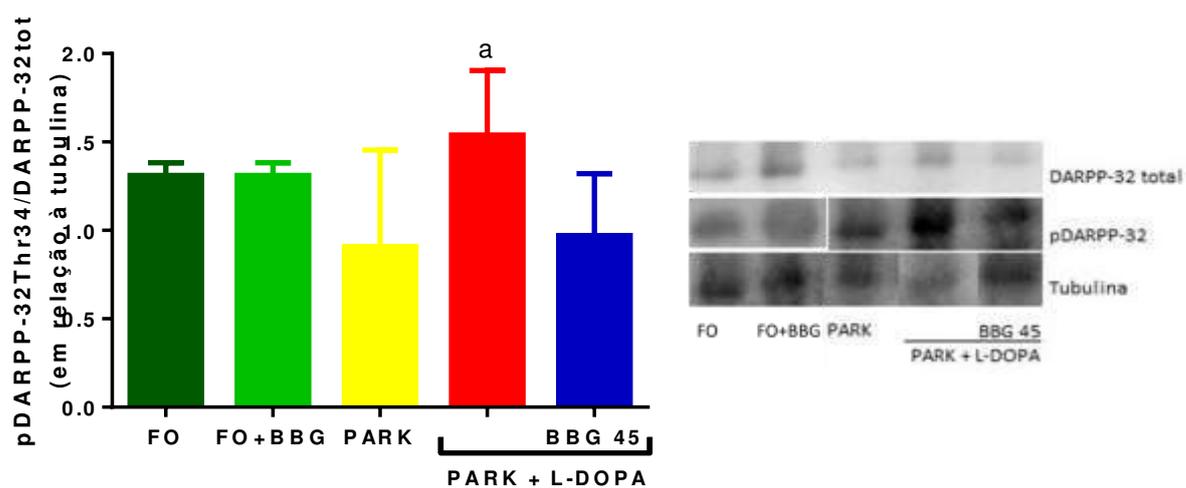
O tratamento com o BBG na dose de 45 mg/kg diminuiu expressão relativa de pDARPP-32Thr34 de maneira significativa no corpo estriado (pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total: PARK + L-DOPA + BBG 45: $1,5 \pm 0,07$) (Figura 25 A), mas não significativamente no mesencéfalo (pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total: PARK + L-DOPA + BBG 45: $0,97 \pm 0,2$) (Figura 25 B).

Figura 25 – Efeito do BBG sobre a relação entre pDARPP-32Thr34/DARPP-32 total no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

A



B

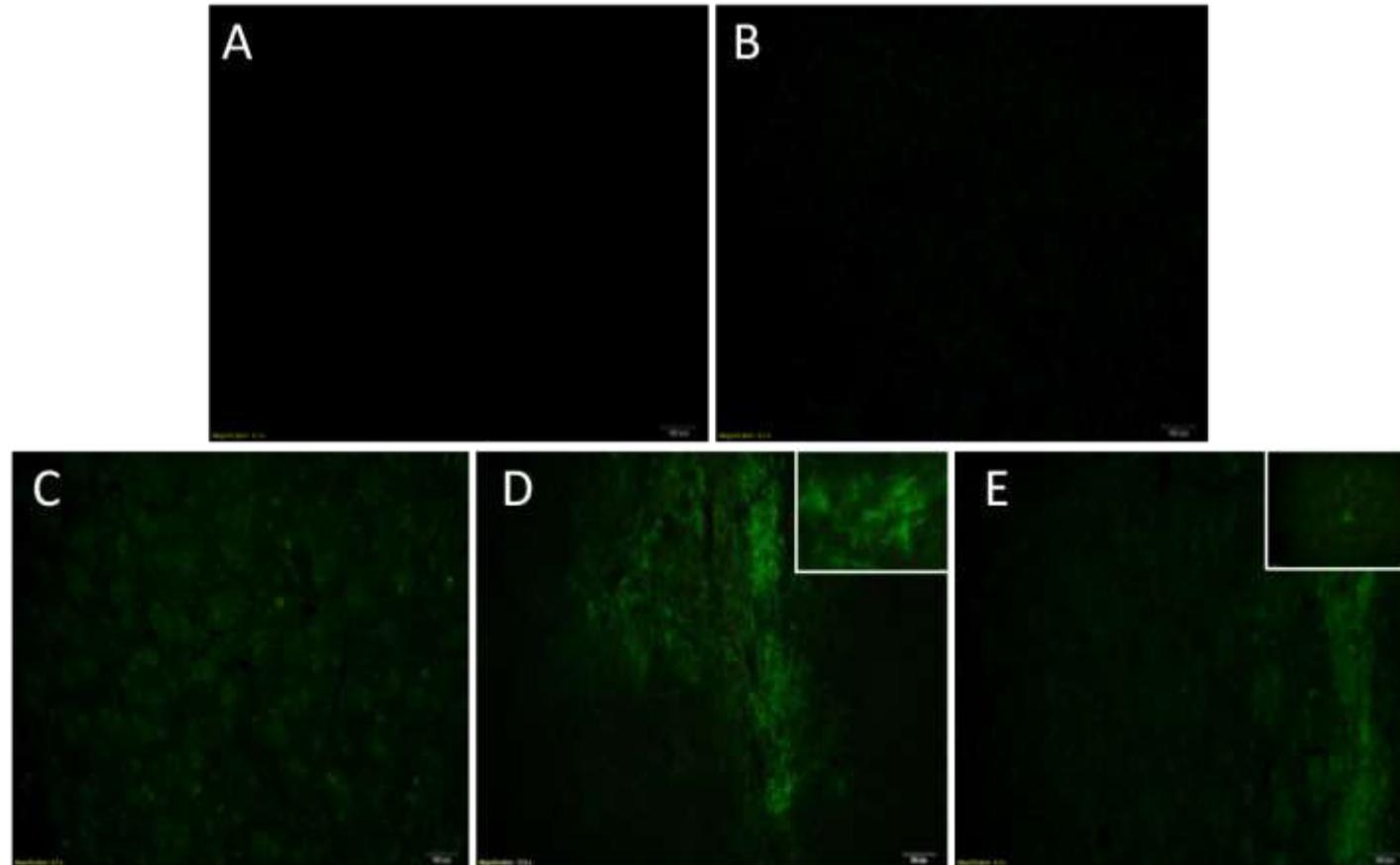


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação das bandas de western-blot no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.12 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre ativação de micróglia avaliada através da imunomarcação por CD11b no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.

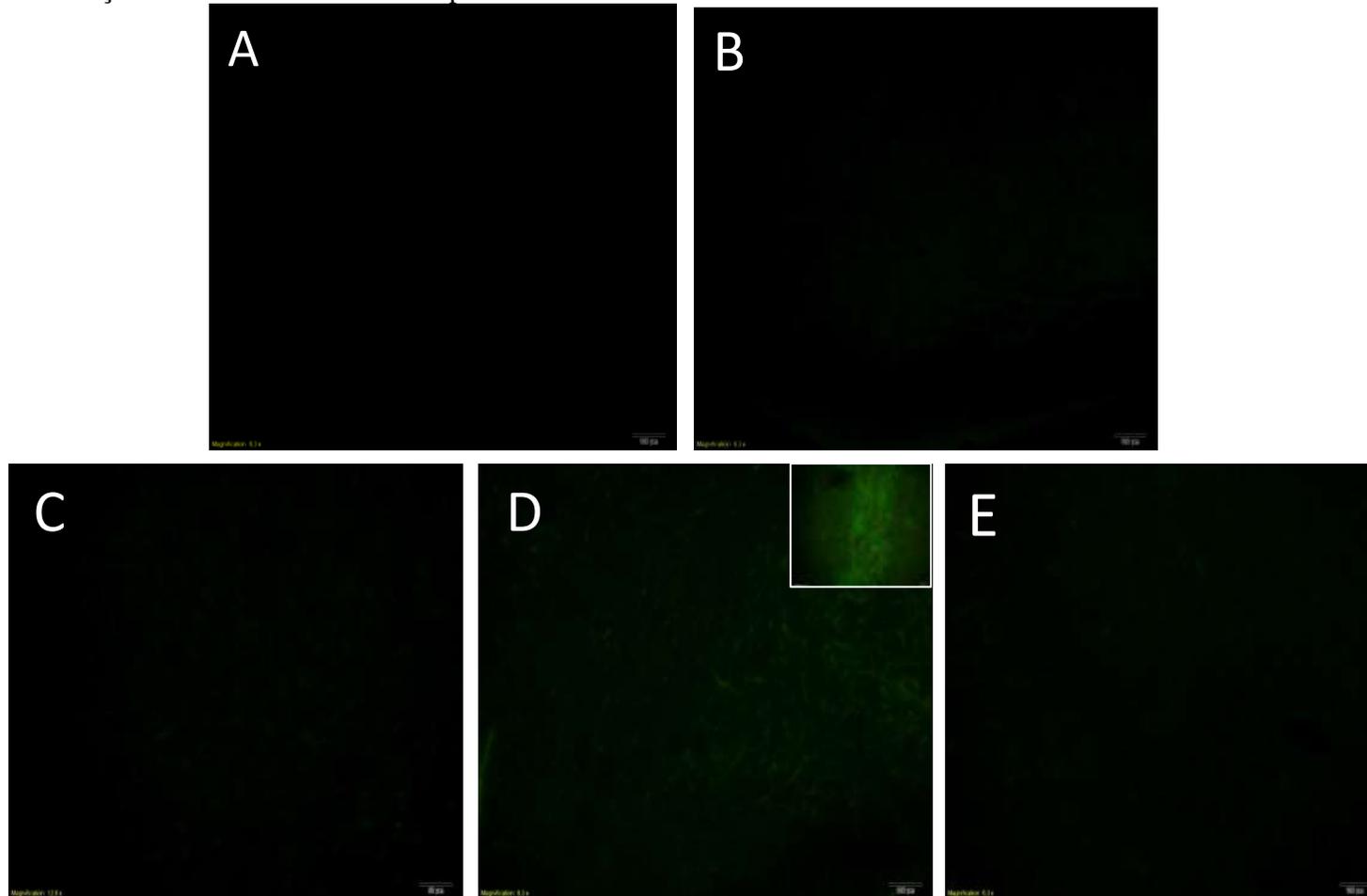
Os animais parkinsonianos não apresentaram aumento significativo da imunofluorescência para CD11b, marcador de micróglia, nem no mesencéfalo (IF: FO: $14,21 \pm 0,52$; PARK: $15,5 \pm 0,63$) (Figuras 27 e 28 B) e nem no corpo estriado (IF: FO: $17,74 \pm 0,87$; PARK: $20,14 \pm 1,18$) (Figuras 26 e 28 A). Os parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram aumento da imunofluorescência para CD11b tanto no mesencéfalo (IF: PARK + L-DOPA: $20,80 \pm 0,96$), como no corpo estriado (IF: PARK + L-DOPA: $23,66 \pm 0,74$). O BBG diminuiu a imunofluorescência para CD11b no mesencéfalo (IF: FO + BBG 45: $15,25 \pm 0,9$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $18,07 \pm 0,6$) (Figuras 27 e 28 B), porém não no corpo estriado (IF: FO + BBG 45: $16,48 \pm 1,29$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $24,03 \pm 0,67$) (Figuras 26 e 28 A), demonstrando ação de diminuir a ativação de micróglia.

Figura 26 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no corpo estriado após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



Microfotografias (aumento de 100 x) representativas da imunomarcção para CD11b em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadro no canto superior direito representa um aumento de 400 x.

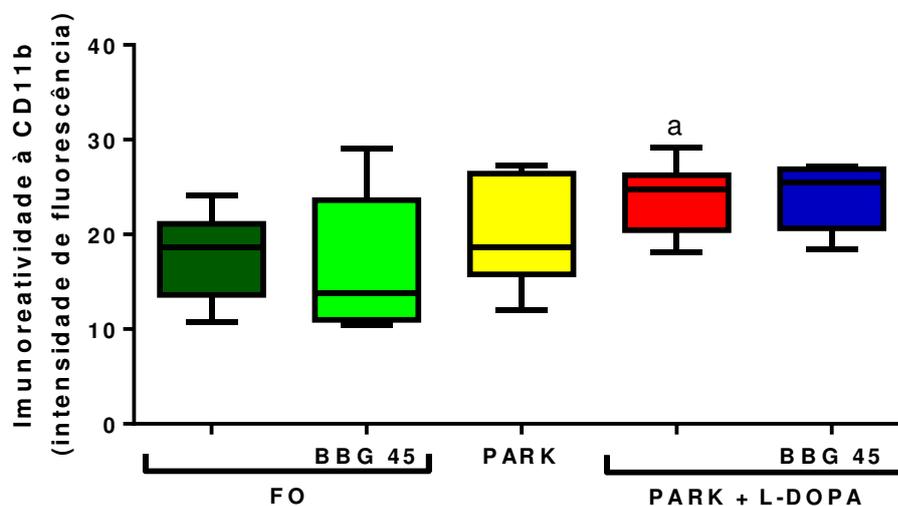
Figura 27 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de micróglia avaliada através de imunomarcção para CD11b no mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA em animais parkinsonianos.



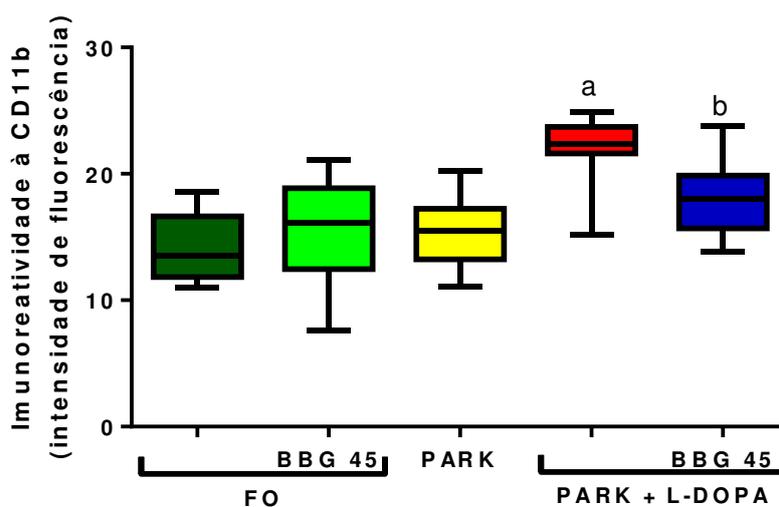
Microfotografias (aumento de 100 x) representativas da imunomarcção para CD11b em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadro no canto superior direito representa um aumento de 400 x.

Figura 28 – Imunofluorescência para CD11b no corpo estriado e mesencéfalo após 22 dias de administração de L-DOPA e BBG em animais parkinsonianos.

A



B

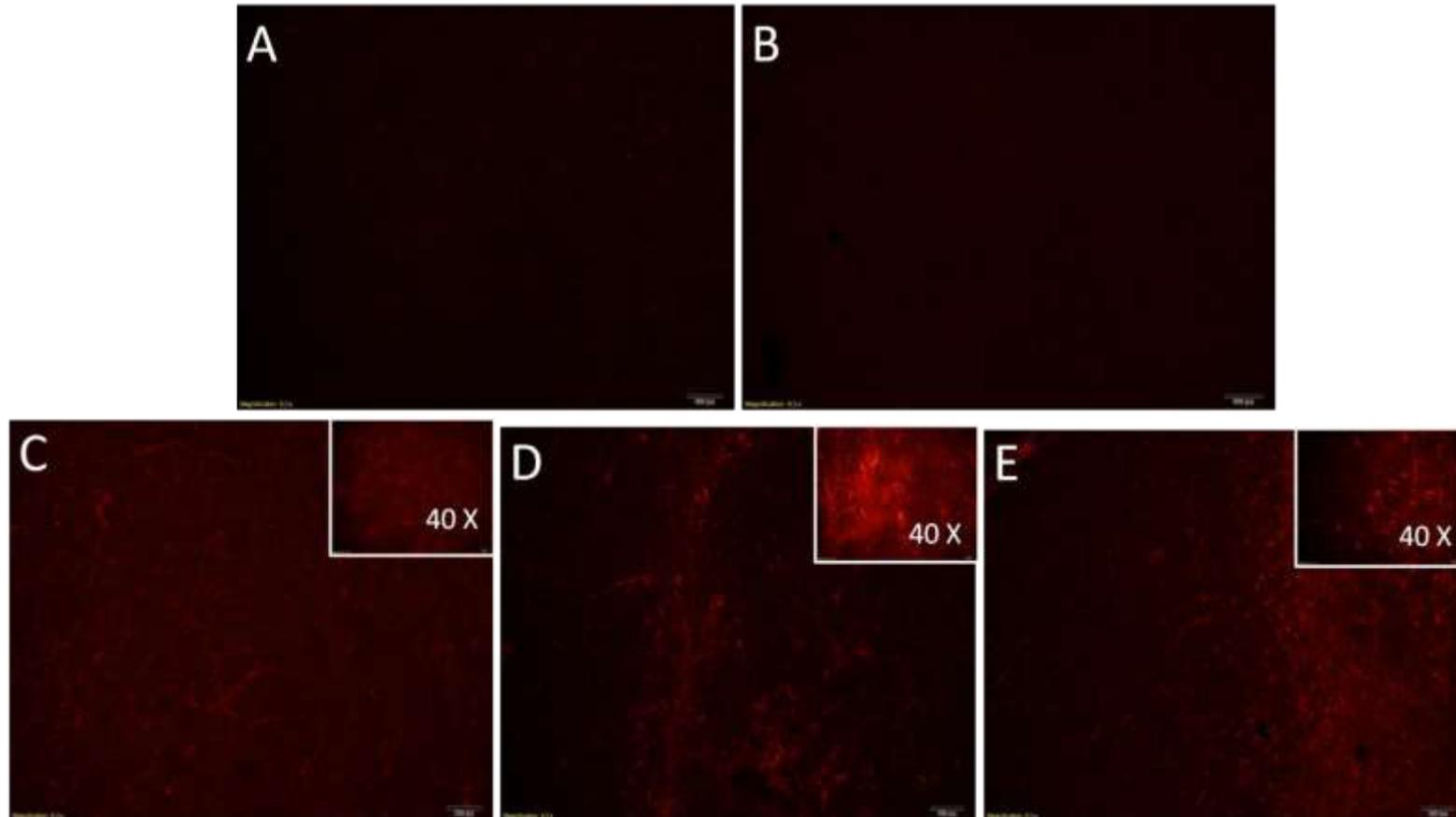


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação da imunomarcção para CD11b no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em mediana (Min-Max). Teste de Mann-Whitney. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA. ($p < 0,05$) (n=4).

5.13 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre ativação de astrócitos avaliada através da imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.

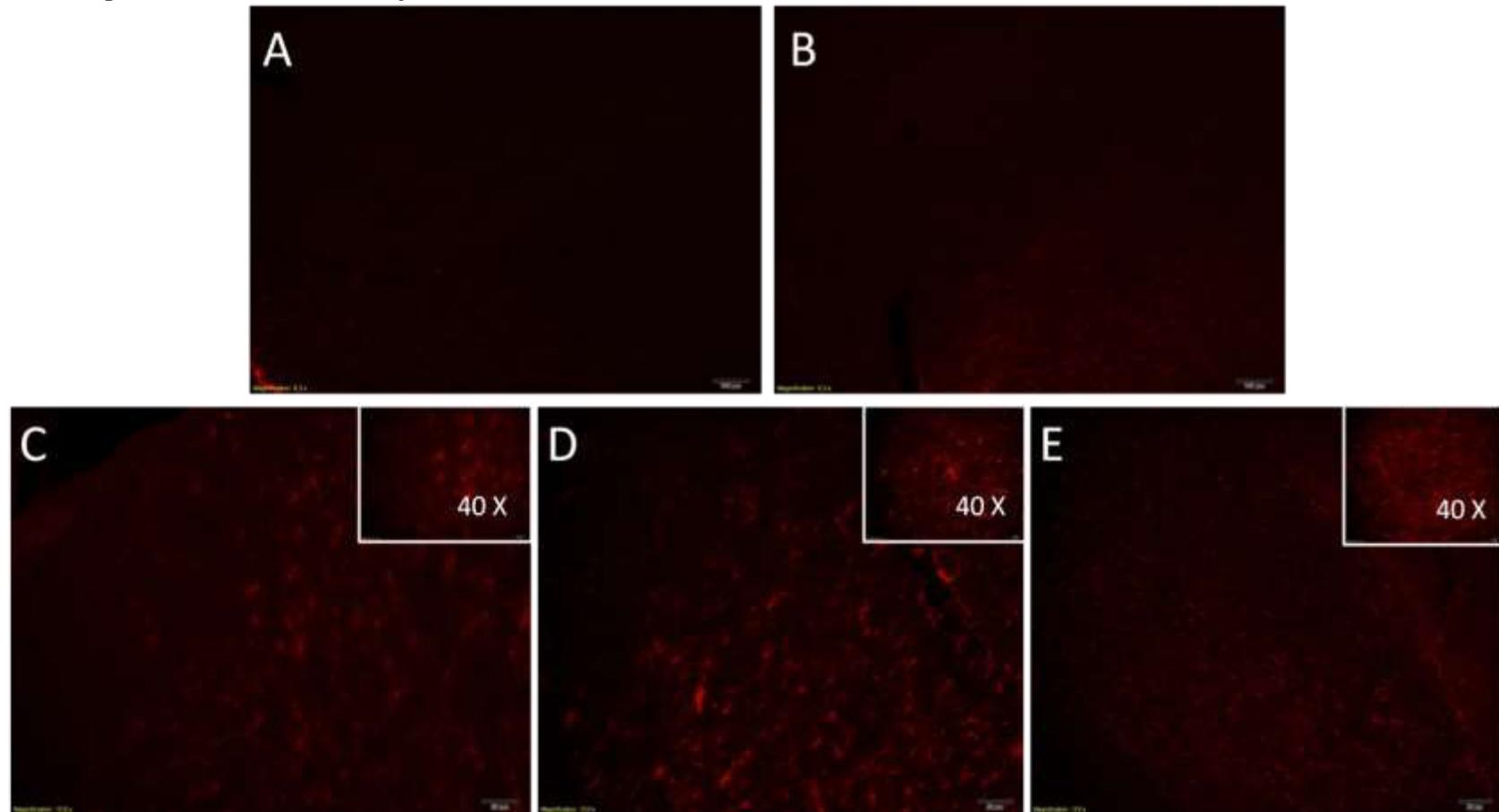
Os animais parkinsonianos apresentaram aumento significativo da imunofluorescência para GFAP quando comparado ao grupo falso-operado, demonstrando aumento da astrogliose induzida pela 6-OHDA mesmo após 36 dias da injeção tanto no mesencéfalo (IF FO: $14,41 \pm 0,4$; PARK: $23,97 \pm 1,7$) (Figuras 30 e 31 B), quanto no corpo estriado (IF FO: $14,89 \pm 0,4$; PARK: $17,4 \pm 0,86$) (Figuras 29 e 31 A). Os animais parkinsonianos que receberam tratamento com L-DOPA demonstraram aumento de imunofluorescência para GFAP em ambas as áreas cerebrais (IF Mesencéfalo: PARK + L-DOPA: $30,4 \pm 1,9$; Corpo estriado: PARK + L-DOPA: $28,29 \pm 2,83$). O BBG diminuiu a astrogliose no mesencéfalo de maneira significativa (IF FO + BBG 45: $19,68 \pm 0,79$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $21,14 \pm 1,35$) (Figuras 30 e 31 B), porém não foi capaz de diminuir no corpo estriado (IF FO + BBG 45: $15,20 \pm 0,87$; PARK + L-DOPA + BBG 45: $30,57 \pm 1,86$) (Figuras 29 e 31 B).

Figura 29 - Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcção por GFAP no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.



Microfotografias (aumento de 100 x) representativas da imunomarcção para GFAP em seções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadro no canto superior direito representa o aumento de 400 x.

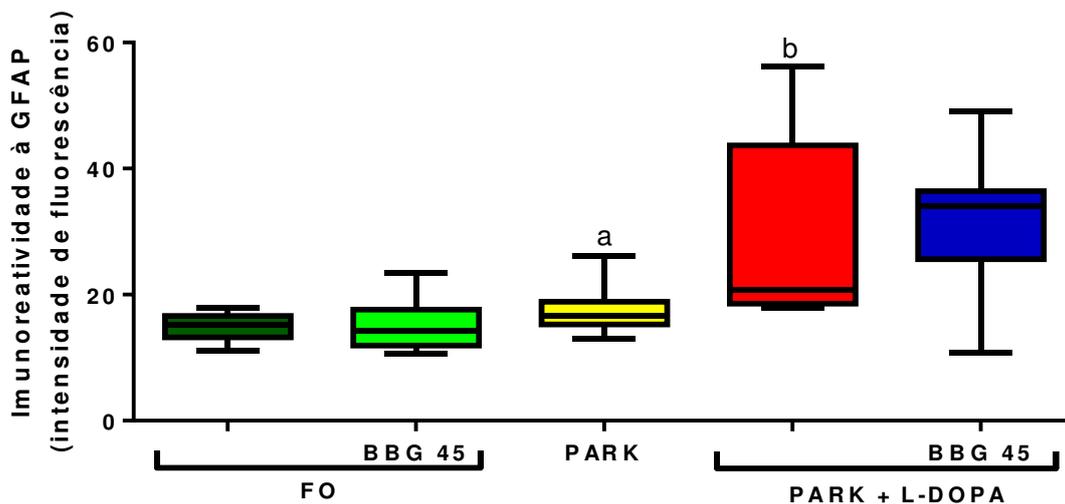
Figura 30 - Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a ativação de astrócitos avaliada através de imunomarcção por GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.



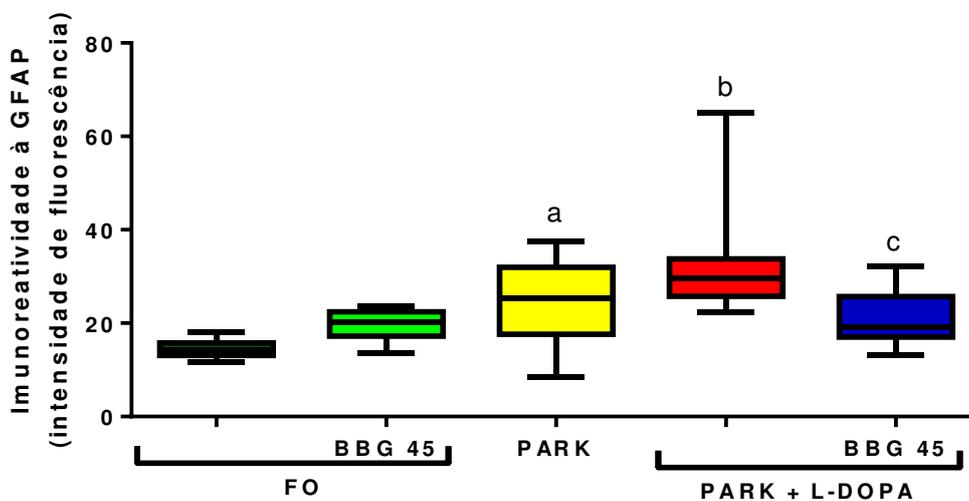
Microfotografias (aumento de 100 x) representativas da imunomarcção para GFAP em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadro no canto superior direito representa o aumento de 400 x.

Figura 31 – Imunofluorescência para GFAP no mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

A



B

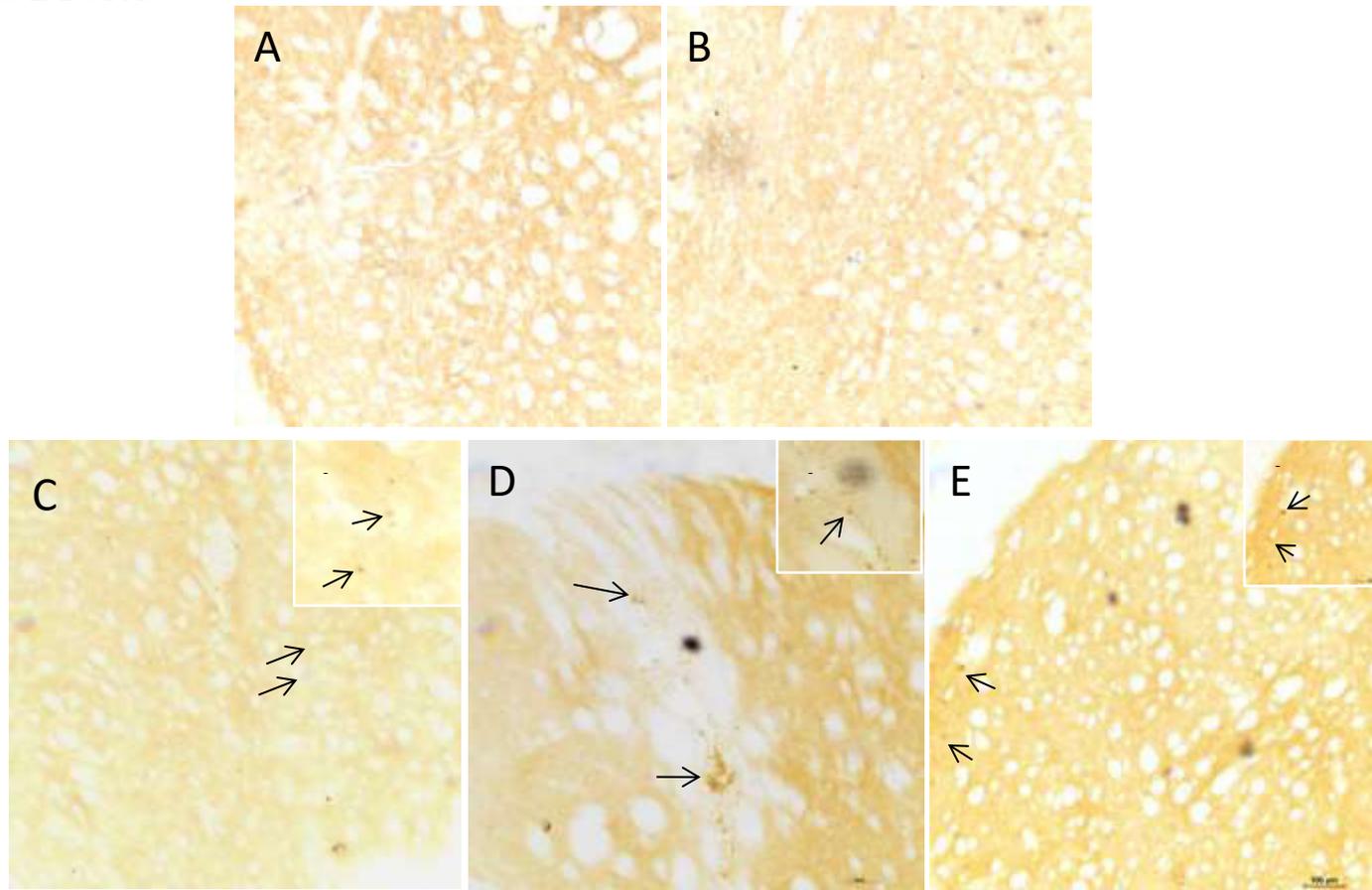


Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação da imunomarcção para GFAP no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em mediana (Min-Max). Teste de Mann-Whitney. ^avs FO, ^bvs PARK, ^cvs PARK + L-DOPA. ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.14 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre a neuroinflamação avaliada através da imunomarcagem de COX-2 no mesencéfalo e corpo estriado de animais parkinsonianos.

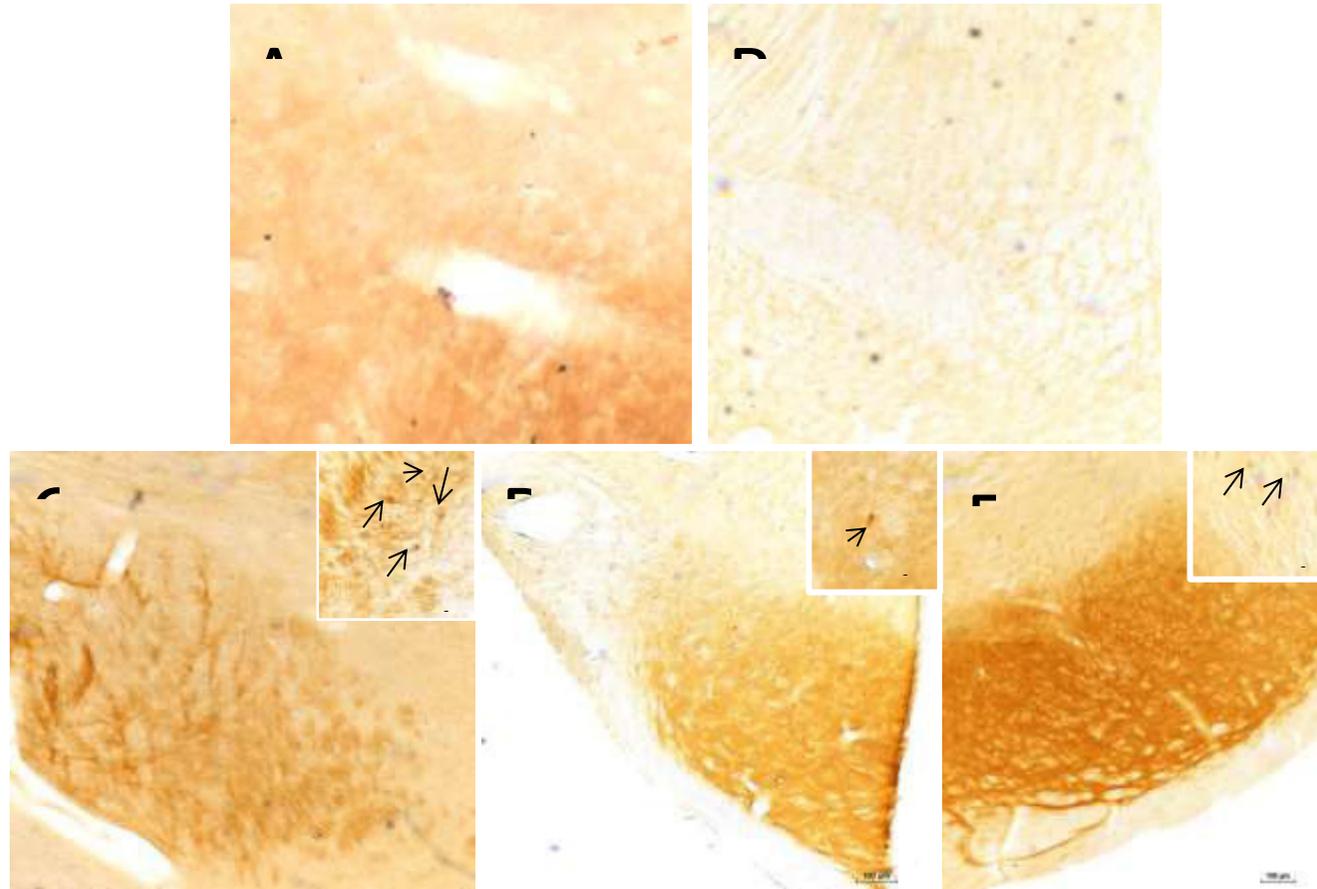
O grupo parkinsoniano não apresentou aumento significativo do número de células COX-2 (Mesencéfalo: FO: $0,34 \pm 0,18$ cél. COX-2 positivas; PARK: $2,67 \pm 0,93$ cél. COX-2 positivas; Corpo estriado: FO: $0,63 \pm 0,24$ cél. COX-2 positivas; PARK: $7,78 \pm 2,25$ cél. COX-2 positivas). O tratamento crônico com L-DOPA aumentou de maneira significativa o número de células COX-2 positivas tanto no mesencéfalo (PARK + L-DOPA: $7,65 \pm 1,16$ cél. COX-2 positivas) (Figuras 33 e 35 B), como no corpo estriado (PARK + L-DOPA: $25,73 \pm 4,9$ cél. COX-2 positivas) (Figuras 32 e 35 A). O tratamento com o BBG diminuiu significativamente o número de células COX2 positivas no corpo estriado (FO + BBG 45: $0,6 \pm 0,2$ cél. COX-2 positivas; PARK + L-DOPA + BBG 45: $6,38 \pm 1,63$ cél. COX-2 positivas), mas não no mesencéfalo (FO + BBG 45: $0,4 \pm 0,2$ cél. COX-2 positivas; PARK + L-DOPA + BBG 45: $6,12 \pm 0,46$ cél. COX-2 positivas) (Figuras 32, 33, 34 A e B).

Figura 32 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcção para COX-2 no corpo estriado de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.



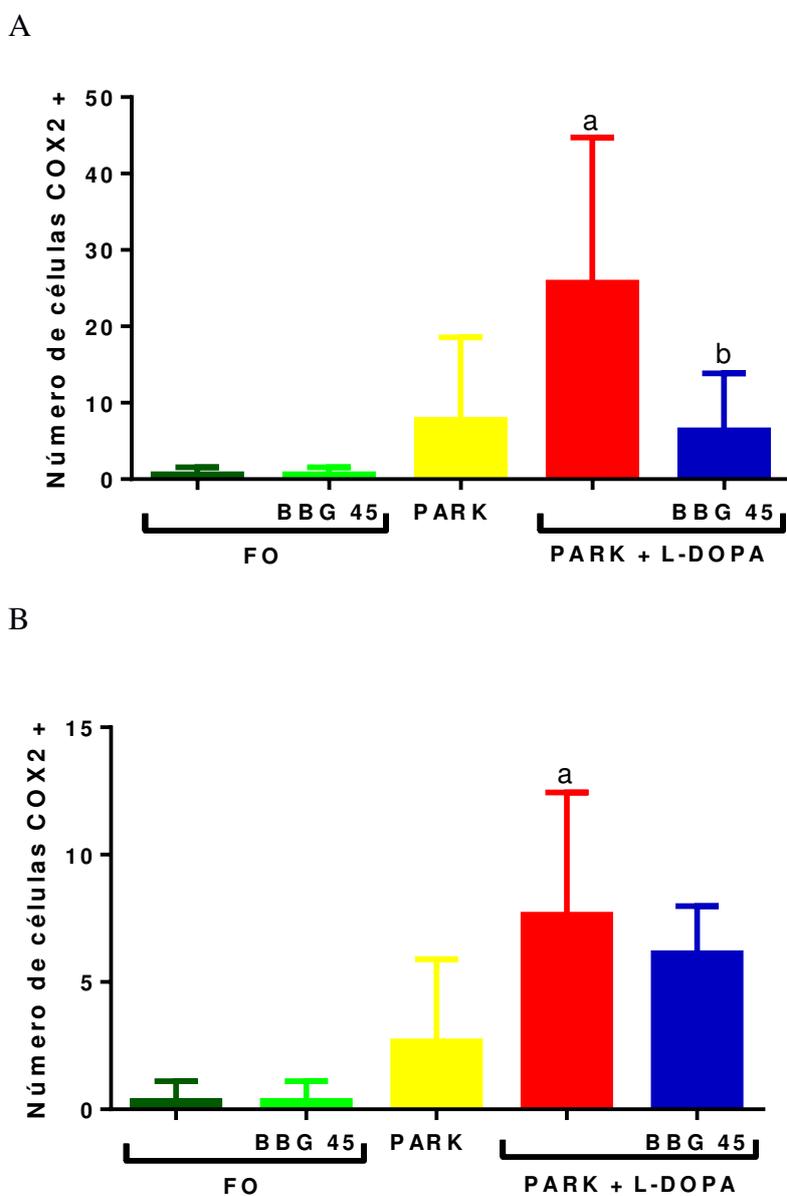
Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do corpo estriado dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadrado no canto superior direito representa o aumento de 100 x.

Figura 33 – Efeito da L-DOPA e do BBG sobre a imunomarcção para COX-2 no mesencéfalo de animais parkinsonianos após 22 dias de administração de L-DOPA.



Microfotografias (aumento de 40 x) representativas da imunomarcção para COX-2 em secções coronais do mesencéfalo dos grupos FO (A), FO+BBG (B), PARK (C), PARK + L-DOPA (D) e PARK + L-DOPA + BBG 45 (E). O quadrado no canto superior direita representa o aumento de 100 x.

Figura 34 – Número de células COX-2 positivas no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.



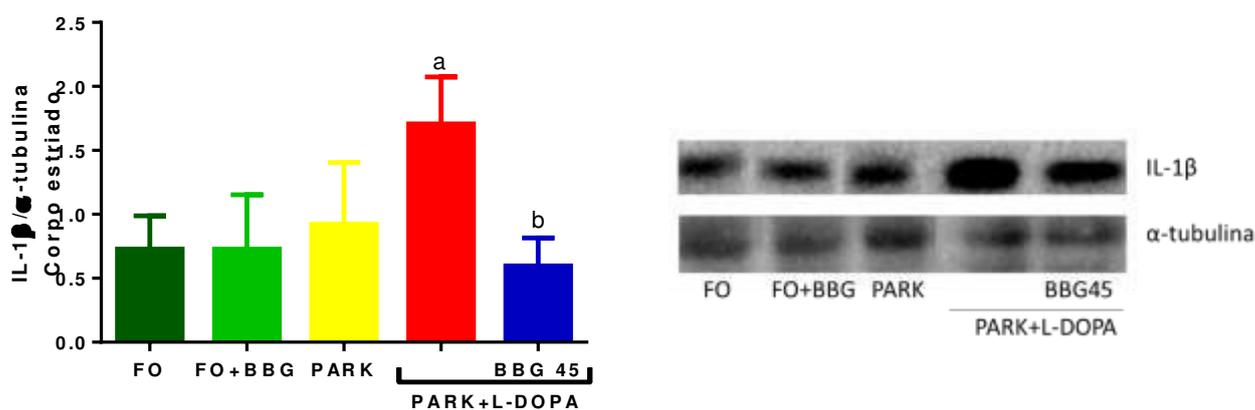
Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg v.o.) e com BBG (45 mg/kg i.p.). Em (A) a quantificação do número de células COX-2 positivas no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA. ($p < 0,05$) ($n=4$).

5.15 Efeito do BBG (45 mg/kg) sobre IL-1 β no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos.

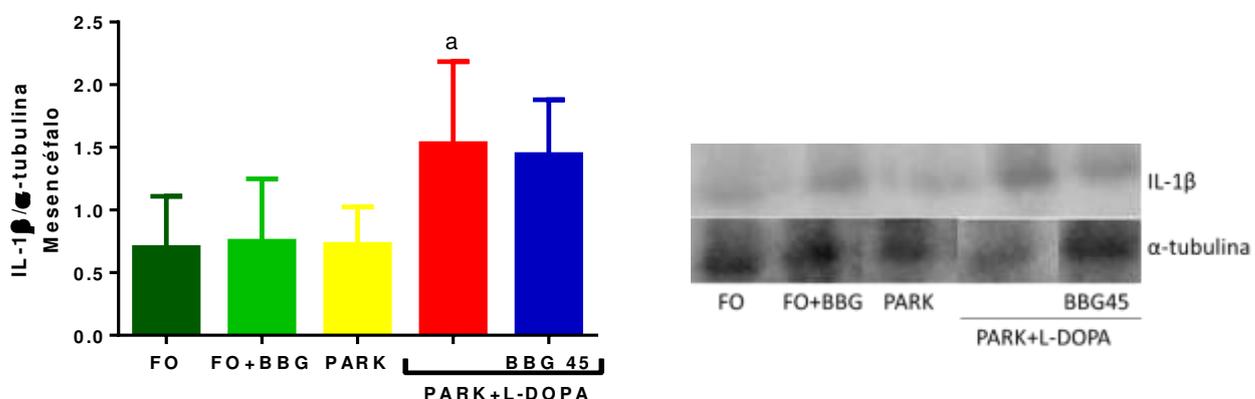
Os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram aumento significativo da expressão de IL-1 β no corpo estriado em relação aos animais parkinsonianos (IL-1 β /Tubulina: FO: 0,72 \pm 0,15; FO+BBG: 0,72 \pm 0,24; PARK: 0,92 \pm 0,27; PARK + L-DOPA: 1,7 \pm 0,21) (Figura 35 A) e no mesencéfalo (IL-1 β /Tubulina: FO: 0,7 \pm 0,2; FO+BBG: 0,75 \pm 0,24; PARK: 0,72 \pm 0,14; PARK + L-DOPA: 1,5 \pm 0,29) (Figura 35 B). O tratamento com o BBG na dose de 45 mg/kg diminuiu a expressão de receptor D1 no corpo estriado (IL-1 β /Tubulina: PARK + L-DOPA + BBG 45: 0,59 \pm 0,12), mas não no mesencéfalo (IL-1 β /Tubulina: PARK + L-DOPA + BBG 45: 1,4 \pm 0,21) (Figura 35 A e B).

Figura 35 – Expressão de IL-1 no corpo estriado e mesencéfalo de animais parkinsonianos tratados com L-DOPA.

A



B



Os animais foram tratados 22 dias com L-DOPA (30 mg/kg) e BBG (45 mg/kg). Em (A) a quantificação das bandas de western-blot no corpo estriado e em (B) no mesencéfalo. Valores expressos em média \pm EPM. ANOVA, seguido do teste de Tukey. ^avs PARK, ^bvs PARK + L-DOPA ($p < 0,05$) ($n=4$).

6 DISCUSSÃO

A L-DOPA ainda é o tratamento mais utilizado para alívio dos sintomas motores causados pela DP, entretanto, causa diversos efeitos colaterais, como as discinesias, que são muitas vezes mais prejudiciais que a própria doença (STAMFORD *et al.*, 2016). Apesar de muitos estudos descreverem os mecanismos da discinesia induzida por L-DOPA, as mudanças fisiopatológicas envolvidas nesse processo ainda são pouco compreendidas. O principal achado deste trabalho é a demonstração de que o bloqueio do receptor P2X7 através do uso crônico do antagonista seletivo, o BBG, nas doses de 22,5 e 45 mg/kg foram capazes de diminuir a discinesia induzida pelo tratamento crônico com L-DOPA em ratos parkinsonianos. Este estudo mostra pela primeira vez o envolvimento do sistema purinérgico nos mecanismos de discinesia induzida por L-DOPA.

O modelo de indução de lesão estriatal pela 6-OHDA em ratos tem sido largamente utilizado para a investigação da discinesia induzida pela administração crônica de L-DOPA, pois a degeneração de células da substância negra é o principal fator responsável pelas alterações na função dos núcleos da base que leva ao aparecimento de discinesia após a administração de L-DOPA (BASTIDE *et al.*, 2015). A extensão desta degeneração não só regula o nível de discinesia, como também regula a duração de exposição necessária à L-DOPA para que se desenvolva a discinesia (JENNER, 2008).

O teste da apomorfina tem sido usado como padrão-ouro para análises de lesões causadas pela 6-OHDA, porque é robusto, confiável e detecta as alterações na sensibilidade dos receptores de dopamina estriatais, proporcionando dessa forma, a verificação de extensas lesões nigroestriatais, tendo já sido utilizado em outros trabalhos do nosso laboratório (MENEZES, 2012; TEIXEIRA *et al.*, 2013). Animais lesionados unilateralmente com 6-OHDA quando desafiados com agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina, apresentam comportamento rotatório para o lado contralateral a lesão, como evidenciado por outros trabalhos do nosso laboratório (CARMO *et al.*, 2014). Isso ocorre porque os receptores pós-sinápticos dopaminérgicos estriatais estão hipersensibilizados no lado desnervado, apresentando um aumento da expressão dos receptores dopaminérgicos, produzindo assim as rotações contralaterais à lesão (GERLACH; RIEDERER, 1996; DEUMENS; BLOKLAND; PRICKAERTS, 2002). No presente trabalho o teste de apomorfina foi realizado para avaliarmos a extensão da lesão nigroestriatal dos animais parkinsonianos e selecionarmos os animais que

apresentavam extensa lesão nigroestriatal para receberem os tratamentos com L-DOPA e/ou BBG.

A discinesia foi avaliada utilizando-se um protocolo que observa o desenvolvimento de movimentos involuntários anormais após a administração de L-DOPA em ratos (LUNDBLAD *et al.*, 2002) e que permite a avaliação de dois aspectos do desenvolvimento da discinesia, o efeito de uma única dose administrada de L-DOPA, bem como os efeitos em longo prazo (CENCI, LUNDBLAD, 2006). No modelo de AIMs em animais lesionados pela 6-OHDA os animais apresentam características complexas semelhantes às características da DP em humanos, como por exemplo o curso de tempo em que se dá o pico de discinesia após uma administração de L-DOPA, perturbações das atividades motoras diárias quando aumenta a severidade da discinesia, a incidência e a severidade da discinesia dependem da dose de L-DOPA administrada, e drogas utilizadas para diminuir a discinesia em humanos, como a amantadina e a clozapina, também diminuem os AIMs neste modelo animal (BASTIDE *et al.*, 2015).

Neste estudo foi evidenciado que após o desafio (administração de uma dose de L-DOPA de 30 mg/kg) realizado no 7º dia depois do início do tratamento com L-DOPA, o aparecimento de AIMs totais se inicia após 40 minutos. Nos desafios realizados no 14º e 21º dia do início do tratamento com L-DOPA observamos que a partir de 20 minutos os animais apresentaram aumento significativo de AIMs totais, assim com outros trabalhos mostram que a exposição repetida a L-DOPA modifica e sensibiliza o cérebro de tal maneira que em longo prazo leva ao aumento da discinesia (NADJAR *et al.*, 2009). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que no início do tratamento ainda existem neurônios intactos e funcionais capazes de captar a L-DOPA, converter em dopamina e armazenar este neurotransmissor em vesículas, liberando de maneira lenta e gradual. O que não ocorre após a depleção completa de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal, fazendo com que ocorra uma liberação pulsada de dopamina no corpo estriado levando ao aparecimento da discinesia (CENCI; LUNDBLAD, 2006), pois já se sabe que a severa degeneração dopaminérgica altera as rotas de captação, recaptação e metabolismo da L-DOPA no cérebro. Estudos têm demonstrado diminuída capacidade cerebral de estocar e eliminar a dopamina exógena após lesões nigroestriatais graves resultando em grande aumento de DA extracelular após administração periférica de L-DOPA (ABERCROMBIE *et al.*, 1990).

Neste trabalho pudemos observar que a L-DOPA induziu discinesia nos animais parkinsonianos nos dias 7, 14 e 21 após o início do tratamento. O efeito discinético da L-DOPA não aumentou ao longo do tratamento quando avaliamos o desenvolvimento de AIMs entre os dias 7, 14 e 21 após o início da administração de L-DOPA, apesar de estudos mostrarem que após exposições repetidas os animais com parkinsonismo induzido pela 6-OHDA apresentam aumento da gradual da discinesia (LUNDBLAD *et al.*, 2002; CUI *et al.*, 2013). No trabalho de LUNDBLAD e colaboradores (2002), a dose utilizada de L-DOPA foi de 6 mg/kg/dia, enquanto que a dose utilizada em nosso estudo foi de 30 mg/kg/dia. Provavelmente esta dose já apresenta o efeito máximo e por isso não conseguimos observar aumento gradual da discinesia ao longo do tempo de tratamento como observado em outros trabalhos. PADOVAN-NETO e colaboradores (2009) demonstraram não haver aumento significativo de AIMs comparando-se a dose de 30 mg/kg/dia e de 100 mg/kg/dia de L-DOPA. No presente trabalho também avaliamos uma dose intermediária de L-DOPA de 60 mg/kg/dia e também não observamos diferença significativa em comparação como a dose de 30 mg/kg/dia (dados não mostrados), sugerindo que a dose de 30 mg/kg/dia de L-DOPA seja a dose máxima capaz de induzir discinesia em modelos animais de DP.

Pacientes com DP recebem diariamente cerca de 2.000 mg de L-DOPA, divididas em 4 doses durante o dia, devido a sua meia-vida curta (JENNER, 2008). No nosso trabalho a dose de 30 mg/kg utilizada corresponderia a uma dose de cerca de 300 mg/kg em humanos. Ou seja, a dose utilizada para induzir a discinesia em ratos é bem menor do que a utilizada por pacientes. Além disso, o tempo de tratamento para que se inicie o aparecimento da discinesia, como observado em nosso estudo, é de apenas 7 dias de tratamento com L-DOPA, enquanto que em humanos são necessários de pelo menos 2,5 anos de tratamento para que se inicie o aparecimento da discinesia (BASTIDE *et al.*, 2015).

No presente trabalho o BBG diminuiu a discinesia nos animais a partir do sétimo dia de tratamento na dose de 45 mg/kg, observado através da diminuição significativa tanto de ALO AIMs como de AIMs locomotores. Este efeito se repete nos dias 14 e 21 de avaliação na dose de 45 mg/kg, enquanto que a dose de 22,5 mg/kg apresentou efeito anti-discinético no 14º e 21º dia, mas não no 7º dia. O efeito anti-discinético do BBG na dose de 22,5 mg/kg aumentou gradualmente ao longo do tratamento, diminuindo significativamente a soma de escores ALO AIMs, enquanto que a dose de 45 mg/kg apresentou efeito máximo desde o 7º dia de avaliação. Na avaliação dos AIMs locomotores ao longo do tempo de tratamento, ambas as doses

apresentaram efeito máximo desde o 7º dia de avaliação. Quando avaliamos o efeito do BBG frente ao desafio de L-DOPA no 7º dia depois do início do tratamento com L-DOPA observamos que a dose de 22,5 mg/kg de BBG não apresentou efeito significativo, enquanto que a dose de 45 mg/kg diminui os AIMS 80 minutos após o desafio. No desafio do 14º dia, ambas as doses, 22,5 e 45 mg/kg, apresentaram efeito anti-discinético 40 minutos após o desafio, e no dia 21º apresentaram efeito anti-discinético 20 minutos após o desafio, demonstrando que após 14 dias de tratamento o BBG atingiu seu efeito máximo em ambas as doses. Fármacos utilizados na clínica para o controle da discinesia induzida por L-DOPA são capazes de inibir o desenvolvimento de ALO AIMS, mas não de inibir os AIMS locomotores (LUNDBLAD *et al.*, 2005). No presente trabalho o BBG foi capaz de inibir tanto o desenvolvimento de ALO AIMS como de AIMS locomotores. O BBG é usualmente utilizado para estudar o papel dos receptores P2X7 em modelos animais e a dose de 45 mg/kg é a mais utilizada (CARMO *et al.*, 2014; BARTLETT *et al.*, 2017). Nesta dose a concentração de BBG no fluido cérebro-espinhal é de cerca de 1 µM, sendo capaz de antagonizar o receptor P2X7 e o receptor de panexina, Panx1 (SPERLÁGH; ILLES, 2014). Apesar de a maioria dos trabalhos utilizar a dose de 45 mg/kg ou maiores para antagonizar o receptor P2X7, neste trabalho buscamos avaliar o efeito de doses intermediárias para avaliar a resposta parcial do bloqueio do receptor P2X7 e avaliar o grau de participação do receptor no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA. Nossos achados sugerem que o BBG possui efeito anti-discinético máximo na dose de 45 mg/kg de BBG, abolindo quase que completamente a discinesia induzida por L-DOPA em animais parkinsonianos.

A coordenação motora é outro aspecto relevante para se avaliar em relação à administração crônica de L-DOPA. Para tal objetivo foi utilizado o teste do rotarod, no qual se observa o desempenho de coordenação motora em ratos parkinsonianos tratados cronicamente com L-DOPA. Nossos resultados mostram que após administração de uma dose de L-DOPA, os animais parkinsonianos apresentam redução de coordenação motora e equilíbrio, assim como descrito na literatura (IDERBERG *et al.*, 2015; PADOVAN-NETO *et al.*, 2009), e o bloqueio dos receptores P2X7 é capaz de diminuir esse déficit. Assim podemos sugerir que o efeito anti-discinético do BBG aumenta com o tratamento prolongado, mesmo em doses intermediárias. Podendo ser eficaz no controle do pico de discinesia após a administração de uma dose de L-DOPA, relatadas na literatura como discinesias do tipo “On”, bem como no controle das

discinesias do tipo “Off”, onde o paciente apresenta um pico de discinesia mesmo sem a administração de uma dose de L-DOPA (GURIDI *et al.*, 2008).

No presente trabalho não observamos efeito neuregenerativo do BBG na dose de 45 mg/kg, pois o mesmo não reverteu a morte neuronal dopaminérgica induzida pela 6-OHDA avaliado através da imunomarcção para tirosina hidroxilase. Trabalho anterior do nosso laboratório demonstrou que o BBG possui efeito neuroprotetor frente à degeneração neuronal em modelo experimental de DP induzido pela 6-OHDA (CARMO *et al.*, 2014). A discrepância de entre esses dados provavelmente se deve ao fato de que o tratamento com o BBG no presente trabalho foi iniciado no 15º dia após a injeção da 6-OHDA no corpo estriado dos animais. Após este período de tempo a lesão causada pela 6-OHDA atinge cerca de 80 % dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. No trabalho de CARMO e colaboradores (2014) o tratamento com BBG foi iniciado 2 h após a injeção da 6-OHDA e continuou ao longo do desenvolvimento da degeneração dos neurônios da via nigroestriatal. Assim, o BBG preveniu a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Neste mesmo trabalho, o BBG foi capaz de diminuir a sinaptotoxicidade e a neuroinflamação através da diminuição da ativação da astrócitos e micróglia, e por sua ação sobre o controle da viabilidade neuronal em cultura de neurônios. Diante do exposto, podemos concluir que a diminuição da discinesia induzida por L-DOPA, observada no teste dos movimentos involuntários anormais, não é reflexo da neuroproteção do BBG frente à ação neurotóxica da 6-OHDA, como evidenciado em trabalhos anteriores, mas sim da sua participação nos mecanismos envolvidos na indução da discinesia por L-DOPA em si, atuando por mecanismos pré e/ou pós-sinápticos, alterando a liberação de DA no corpo estriado.

É importante observarmos que o tratamento com L-DOPA, iniciado no 15º dia após a injeção da 6-OHDA, também não é capaz de reverter à morte neuronal causada pela neurotoxina, pois o tratamento com L-DOPA é uma estratégia de reposição de dopamina e não tem a capacidade de interferir nos mecanismos fisiopatológicos que induzem a morte neuronal dopaminérgica não possuindo ação de neuroregeneração em modelos experimentais (PADOVAN-NETO *et al.*, 2013). Assim como clinicamente o tratamento crônico com a L-DOPA em pacientes com DP não é capaz de inibir a progressão da doença (KATZENSCHLAGER; LEES, 2002). Como podemos observar, o antagonismo do receptor P2X7 além de possuir efeitos neuroprotetores, se utilizado antes da lesão se instalar por completo, possui efeitos anti-discinéticos, quando utilizado concomitantemente ao tratamento

mais utilizado atualmente, tornando assim o receptor P2X7 um alvo farmacológico muito interessante frente aos tratamentos atuais da DP.

A degeneração neuronal também foi avaliada através da coloração com fluoro-jade C para a confirmação de que o bloqueio dos receptores P2X7 não esteja diminuindo a morte neuronal na via nigroestriatal e por isso diminuindo a discinesia induzida por L-DOPA. O fluoro-jade C é um corante fluorescente que marca neurônios em degeneração tanto necrótica como apoptótica. Nossos dados mostram que não foram encontradas alterações significativas, 36 dias após a lesão por 6-OHDA quando avaliamos a intensidade de formação de fluorescência através da coloração com fluoro-jade C. Trabalhos anteriores do nosso laboratório demonstraram que animais lesionados por 6-OHDA apresentam intensa degeneração neuronal visualizada através da coloração de fluoro-jade C, porém nesses trabalhos a coloração foi realizada 19 dias após a lesão (NEVES *et al.*, 2015). EHARA; UEDA (2005) avaliaram a coloração de fluoro-jade C após a lesão por 6-OHDA em ratos da variedade *Sprague-Dawley* e não encontraram células fluoro-jade C positivas 1 mês após a lesão intraestriatal, corroborando com os nossos resultados. O BBG não apresentou efeito neuregenerador frente à degeneração neuronal na coloração por fluoro-jade C, resultado que era esperado visto que na imunomarcação para tirosina hidroxilase o BBG também não foi capaz de diminuir a lesão nigroestriatal causada pela 6-OHDA. Além disso, a coloração com fluoro-jade C foi realizada no 36º dia após a injeção da neurotoxina, não havendo mais a presença de neurônios em degeneração, provavelmente removidos pelos mecanismos de limpeza do SNC.

O DAT, presente na membrana pré-sináptica de neurônios dopaminérgicos realiza a recaptação da DA, diminuindo seu conteúdo na fenda sináptica. A degeneração neuronal dopaminérgica leva a diminuição dos níveis de DAT, bem como de outros transportadores como SERT e NET (transportador de serotonina e de norepinefrina, respectivamente) (ARAI *et al.*, 2008). No presente trabalho os níveis de DAT estão diminuídos no mesencéfalo e corpo estriado dos animais parkinsonianos e nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA, assim como demonstra a literatura (KRAEMMER *et al.*, 2014). O BBG, por sua vez, aumentou dos níveis de DAT, no mesencéfalo, mas não no corpo estriado. Os transportadores de monoaminas, especialmente o DAT, desempenham papel essencial na transmissão corticoestriatal. Estudos mostram que a administração de antagonista de DAT, GBR-12909, aumentou a discinesia induzida por L-DOPA em ratos submetidos a lesão intra-estriatal por 6-OHDA, bem como o antagonismo do transportador de noradrenalina (NET) aumentou a discinesia nos animais

(CONTI *et al.*, 2016) e o uso de inibidores da recaptação de serotonina, como o escitalopram e a paroxetina, diminuíram a discinesia de animais lesionados por 6-OHDA (CONTI *et al.*, 2014). O aumento de DAT no mesencéfalo dos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA e BBG favorece o transporte da L-DOPA para dentro dos neurônios dopaminérgicos remanescentes, bem como para o interior de neurônios não dopaminérgicos capazes de converter a L-DOPA em DA. Este mecanismo possivelmente é um dos responsáveis pelo efeito anti-discinético do BBG, pois o aumento de DAT irá favorecer a reciclagem da DA, podendo levar a uma liberação prolongada de DA após a administração de uma dose de L-DOPA nos animais parkinsonianos. Os dados encontrados neste estudo demonstram que de alguma maneira os receptores P2X7 estão estabilizando a liberação de DA no espaço extracelular, fazendo com que diminua a discinesia dos animais tratados com L-DOPA.

Na clínica, no início do tratamento com a L-DOPA, os neurônios remanescentes são capazes de captar a L-DOPA, converter em DA, armazená-las nas vesículas por longos períodos e liberá-las de maneira gradual, prolongando assim os efeitos de controle dos sintomas motores da DP e diminuindo o risco aparecimento da discinesia (HUOT *et al.*, 2013). Porém, com a progressão da doença ocorre a diminuição da eficácia clínica da LDOPA e o aumento do risco do aparecimento de efeitos adversos, como a discinesia (JENNER, 2008). Clinicamente, já se sabe que a liberação gradual de DA através do uso de fórmulas farmacêuticas de liberação prolongada de L-DOPA diminui os efeitos discinéticos da L-DOPA (REN *et al.*, 2011), assim como se observa aumento da eficácia clínica em pacientes submetidos a administração contínua intravenosa ou intraduodenal de L-DOPA em relação ao controle dos sintomas motores (STOCCHI 2009; IRVANI & JENNER, 2011).

No presente trabalho observamos o aumento significativo da expressão de receptor D1 e da proteína pDARPP-32Thr34 no mesencéfalo e no corpo estriado dos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA. O aumento da ativação da via direta dos circuitos dos núcleos da base é um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento de discinesia após a exposição a doses repetidas de L-DOPA (CENCI; LUNDBLAD, 2006). Após tratamento crônico com L-DOPA em ratos observa-se o aumento da expressão de RNAm do receptor D1 (KORANDI *et al.*, 2014), além disso ocorre o aumento da proteína pDARPP-32Thr34, sendo esta fosforilação relacionada ao aumento ativação de receptores D1. O aumento da fosforilação da proteína DARPP-32 nos animais com parkinsonismo experimental induzido pela 6-OHDA tratados cronicamente com L-DOPA apresentaram alterações na plasticidade sináptica dos

neurônios dopaminérgicos (PICCONI *et al.*, 2003, PISANI *et al.*, 2005). A plasticidade sináptica, que é a capacidade de modificação na eficiência de transmissão sináptica, ocorre como resultado a um estímulo. Dois fenômenos estão relacionados à plasticidade sináptica de longa duração: a potenciação de longa duração (LTP) e a depressão de longa duração (LTD) (RUGGIERO *et al.*, 2011). O LTP está diminuído em modelos animais de DP (CHASE *et al.*, 2000). O tratamento com L-DOPA restabelece o LTP em animais submetidos à modelo experimental de DP induzido pela 6-OHDA que ainda não apresentam discinesia. Animais que apresentam discinesia induzida pelo tratamento com L-DOPA não apresentam o reestabelecimento do LTP, e apresentam aumento anormal de DARPP-32 fosforilada na treonina 34 (PISANI *et al.*, 2005), demonstrando assim que o uso crônico de L-DOPA induz alterações na plasticidade sináptica neuronal, estando este mecanismo relacionado a indução da discinesia.

No presente trabalho o tratamento com o BBG diminuiu significativamente a expressão de receptores D1 no corpo estriado dos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA, mas não no mesencéfalo. Observamos uma diminuição significativa da proteína pDARPP-32Thr34 no corpo estriado e não significativa no mesencéfalo dos animais parkinsonianos discinéticos tratados com BBG. A redução da expressão de receptores D1 pelo BBG bem como a redução da expressão de pDARPP-32Thr34 provavelmente está relacionada ao efeito anti-discinético do BBG, pois o uso de antagonistas do receptor D1 reduz os movimentos involuntários anormais em ratos parkinsonianos (FIORENTINI *et al.*, 2013; SEBASTIANUTTO *et al.*, 2016), bem como o uso de agonista de receptor D1 aumenta a discinesia em ratos submetidos a modelo experimental de DP. A ativação desta via leva ao aumento da ativação de ERK1/2, que está envolvido em processos de plasticidade sináptica (FIORENTINI *et al.*, 2013). O aumento da expressão de receptores D1 na superfície da membrana celular pode ser uma resposta frente à diminuição da quantidade de dopamina disponível para a ativação desta via, atuando como um mecanismo compensatório (VOON *et al.*, 2017). Porém, a exposição repetida a L-DOPA leva a liberação pulsada de DA no corpo estriado e em períodos entre a administração de doses de L-DOPA ocorre uma diminuição repentina da quantidade de DA no corpo estriado, o que estaria promovendo um aumento do tráfico dos receptores D1, fazendo com que ocorra um aumento da ativação desta via (FEYDER *et al.*, 2011). Nossos dados sugerem que o BBG atue diminuindo a ativação da via direta e,

possivelmente diminuindo as alterações sinápticas induzidas pela L-DOPA, bem como a discinesia.

No início da DP, onde ocorre a perda de 50 % de neurônios dopaminérgicos, iniciam-se a atuação de mecanismos compensatórios capazes de promover a manutenção da função motora nos indivíduos. Nesta situação, processos não dopaminérgicos que reduzem a atividade da via indireta dos circuitos dos núcleos da base podem estar envolvidos ainda mais cedo na progressão da perda de neurônios dopaminérgicos e servem para manter a função motora (BEZARD *et al.*, 2003). Para manter o tônus dopaminérgico, normalmente os neurônios dopaminérgicos quiescentes são envolvidos enquanto outros neurônios respondem através do disparo explosivo para manter a liberação quantal de dopamina. Após a perda de mais de 70 % dos neurônios dopaminérgicos, os mecanismos compensatórios começam a falhar, iniciando-se alterações da plasticidade sináptica neuronal (IRVANI, MCCREARY, JENNER, 2011). Na discinesia ocorre um aumento do acoplamento dos receptores D1 à proteína $G\alpha_s$, aumentando a ativação de adenílil ciclase, levando o aumento de AMPc (AUBERT *et al.*, 2005; RANGEL-BARAJAS *et al.*, 2011; PICCONI *et al.*, 2003; FIORENTINI *et al.*, 2013). A proteína pDARPP-32Thr34 é um importante mediador da sinalização intracelular relacionada ao AMPc (GREENGARD, 2001). Um dos possíveis mecanismos pelos quais o DARPP-32 participa na discinesia induzida por L-DOPA é através da indução da expressão gênica de FosB e a regulação do estado de fosforilação de ERK1 e ERK2, proteínas de sinalização intracelular envolvidas no processo de plasticidade neuronal (CUI *et al.*, 2014).

O tratamento crônico com L-DOPA induz a perda de plasticidade sináptica bidirecional (PICCONI *et al.*, 2003) e parece aumentar a ativação de receptor D1 através da alteração das interações funcionais entre os receptores D1 e D2 dos neurônios espinhais após doses repetidas (PEREZ *et al.*, 2017). No presente trabalho observamos que os animais parkinsonianos tratados com L-DOPA apresentaram uma diminuição significativa da expressão de receptor D2 no mesencéfalo dos animais parkinsonianos, porém não foram observadas alterações no corpo estriado. Não existe um consenso geral em relação à participação dos receptores D2 no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA. Enquanto que o antagonismo do receptor D2 diminui a discinesia induzida por L-DOPA em animais com parkinsonismo experimental induzido pela 6-OHDA (SEBASTIANUTTO *et al.*, 2016), a inibição genética do receptor D2 não é capaz de inibir a discinesia induzida por L-DOPA (DARMOPIL *et al.*, 2009). O tratamento com o BBG não foi capaz de induzir aumento da

expressão do receptor D2 nem no corpo estriado e nem no mesencéfalo, o que demonstra que o efeito anti-discinético do bloqueio do receptor P2X7 pelo BBG não atue por esta via.

Na literatura existe evidência de que os receptores purinérgicos, tanto P2Y quanto P2X estão relacionados com a liberação de dopamina por neurônios dopaminérgicos e que o ATP atua modulando esta liberação (ZHANG *et al.*, 2005; KRUGEL *et al.*, 2001). O bloqueio de receptores purinérgicos pelo PPADS e pela suramina, antagonistas não seletivos dos receptores P2, aboliu os disparos espontâneos em cultura de neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, diminuindo o influxo de Ca^{2+} (CHOI *et al.*, 2009). Levando em consideração que os receptores P2X são canais permeáveis ao Ca^{2+} e que a exocitose vesicular é Ca^{2+} dependente, acredita-se que o ATP controle a liberação de DA. Assim, nossos achados nos levam a acreditar que o aumento da ativação dos receptores P2X7 pelo ATP liberado de células dopaminérgicas lesionadas por 6-OHDA esteja contribuindo para o desenvolvimento da discinesia, uma vez que altera a liberação de DA no corpo estriado.

O receptor P2X7, nos astrócitos, quando ativado pelo ATP extracelular leva a abertura dos hemicanais de panexina que irão mediar a toxicidade relacionada ao Ca^{2+} , e este fenômeno se dá pela ação em conjunto do receptor NMDA e do P2X7, levando a morte celular (BENNETT *et al.*, 2013). Sabe-se que durante a discinesia ocorre um aumento da atividade corticoestriatal mediada por glutamato que, ativando os receptores NMDA, leva ao desenvolvimento de discinesia (HEUMANN, 2014). Em modelos animais foi observado que ratos discinéticos apresentam aumento da expressão de subunidades do receptor NMDA (FIORENTINI *et al.*, 2006), mostrando assim o envolvimento do receptor NMDA com o desenvolvimento da discinesia. Se o receptor P2X7, juntamente com o NMDA são capazes de abrir hemicanais de panexina, levando a morte celular, e na discinesia observamos o aumento da atividade glutamatérgica corticoestriatal, seria razoável especular que o receptor P2X7 esteja atuando, juntamente com o NMDA, promovendo o aumento da discinesia e este mecanismo provavelmente envolve a participação de células da glia, como os astrócitos.

Nossos dados tomados em conjunto sugerem que o receptor P2X7 possui papel importante na fisiopatologia do desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA. Porém, os mecanismos pelos quais o sistema purinérgico interfere no desenvolvimento da discinesia ainda não estão totalmente esclarecidos. Para elucidar como o bloqueio do receptor P2X7 diminui a discinesia induzida por L-DOPA, e visto que o receptor P2X7 está relacionado a

inflamação, investigamos a indução de neuroinflamação pela L-DOPA e o efeito do BBG neste mecanismo.

A neuroinflamação tem se tornado relevante como fator para o desenvolvimento de discinesia. BARNUM e colaboradores (2008) demonstraram que a administração de corticosterona exógena em ratos lesionados por 6-OHDA diminui o desenvolvimento de discinesia através da diminuição dos níveis de IL-1 β . Modelos animais de DP através da injeção da 6-OHDA levam ao aumento da atividade de micróglia e astrócitos, aumentando a neuroinflamação (CARMO *et al.* 2014; NEVES *et al.*, 2015; KEMPURAK *et al.*, 2016; GHADERY *et al.*, 2017). A participação do receptor P2X7 na neuroinflamação já está bem estabelecida. O receptor P2X7 no SNC está presente principalmente em células da glia e é ativado em diversas situações de dano neuronal pelo ATP (BURNSTOCK *et al.*, 2011). Devido a sua participação nas cascatas da neuroinflamação, o receptor P2X7 tem sido alvo de muitos estudos acerca de doenças do SNC que envolvem a inflamação, como a própria DP (ARULKUMARAN *et al.*, 2011). Clinicamente já se sabe que pacientes com DP apresentam aumento de interleucinas inflamatórias (BLUM-DEGEN *et al.*, 1995; MOGI *et al.*, 1994) e de micróglia ativada (MCGEER *et al.*, 1988; BANATI *et al.*, 1998; MIRZA *et al.*, 2000; GERHARD *et al.*, 2006; OUCHI *et al.*, 2005).

No presente trabalho observamos aumento da microgliose e astrogliose nos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA. Estes achados estão relacionados à administração crônica da L-DOPA e não apenas a lesão causada por 6-OHDA, visto que o tratamento com L-DOPA aumentou a microgliose e a astrogliose significativamente em relação aos animais parkinsonianos. Sugerindo, assim, que a L-DOPA, administrada cronicamente, possui ação pró-inflamatória, sendo este mecanismo relacionado ao desenvolvimento da discinesia. Nossos achados corroboram com outros estudos na literatura que já haviam demonstrado o aumento da neuroinflamação relacionado a L-DOPA, onde se observou o aumento da microgliose, da astrogliose e da expressão de iNOS em animais submetidos à modelo experimental de DP induzida pela 6-OHDA e tratados cronicamente com L-DOPA, e que o uso de um bloqueador da NOS, o 7-NI, diminuiu a discinesia nesses animais (BORTOLANZA *et al.*, 2015). No nosso trabalho o bloqueio do receptor P2X7 pelo BBG diminuiu a astrogliose e a microgliose induzidas pela L-DOPA no mesencéfalo, apesar de não ter apresentado efeito significativo no corpo estriado. O receptor P2X7 está relacionado com a inflamação induzida em situações patológicas como nas doenças neurodegenerativas (RODRIGUES, TOMÉ, CUNHA, 2015).

No presente trabalho pudemos observar o aumento da expressão de IL-1 β no corpo estriado e mesencéfalo dos animais parkinsonianos tratados com L-DOPA. Corroborando com os nossos resultados, observa-se que a administração crônica de L-DOPA em ratos com parkinsonismo induzido pela 6-OHDA promove, no lado ipsilateral a lesão, o aumento de RNAm de IL-1 β , e que o uso de antagonista de receptor de IL-1 β possui efeito anti-discinético (BARNUM *et al.*, 2008). Esses dados sugerem que a L-DOPA aumenta a ativação de células da glia, levando ao aumento da liberação de IL-1 β . IL-1 β aumenta a ativação de ERK, através de uma via PKC-dependente e exacerba a excitotoxicidade (ARULKUMARAN *et al.*, 2011), provavelmente participando da indução de discinesia por L-DOPA.

O aumento da excitotoxicidade também é observado após longos períodos de administração de L-DOPA (KORANDI *et al.*, 2004). Como descrito anteriormente, o aumento da ativação de ERK está envolvido nas alterações de plasticidade sináptica durante o desenvolvimento de discinesia após o tratamento crônico com L-DOPA, sugerindo assim que a neuroinflamação esteja colaborando para o desenvolvimento da discinesia mediado pela L-DOPA. O tratamento com o BBG foi capaz de diminuir a expressão de IL-1 β em animais parkinsonianos tratados com L-DOPA. Sabe-se que a ativação de receptores P2X7 pelo ATP, liberado de células em degeneração como ocorre na DP, ativa as células da glia, principalmente, micróglia, que libera IL-1 β ou ainda levando a produção de espécies reativas de oxigênio (LEE *et al.*, 2011). Sendo assim, o bloqueio do receptor P2X7 pelo BBG, possivelmente, esteja contribuindo para a diminuição da discinesia através da diminuição da liberação de IL-1 β pelas células da glia, que por sua vez está ativa cascatas de sinalização intracelular que participam nas alterações de plasticidade sináptica envolvidas no desenvolvimento da discinesia. Possivelmente, este seja um dos mecanismos pelos quais o BBG possui ação anti-discinética.

A liberação de IL-1 β promovida pelo ATP é capaz de induzir ou aumentar a liberação de óxido nítrico, a ativação de COX-2, formação de ânion superóxido e de outros mediadores inflamatórios (ARULKUMARAN *et al.*, 2011). Neste trabalho pudemos observar que a administração crônica de L-DOPA foi capaz de aumentar a imunomarcagem de COX-2, fortalecendo a proposta de que ocorre um aumento da neuroinflamação mediada por L-DOPA. Assim como em nosso estudo, BORTOLANZA e colaboradores (2016) demonstraram o aumento da expressão de COX-2 nos animais tratados com L-DOPA por 21 dias e que o aumento da expressão de COX-2 não ocorreu no lado contralateral a lesão por 6-OHDA, demonstrando assim que a degeneração neuronal induzida pela 6-OHDA seja o mecanismo

principal para a presença da COX-2. BORTOLANZA e colaboradores (2016) sugerem que a COX-2 esteja relacionada diretamente ao desenvolvimento de discinesia induzida por L-DOPA em animais lesionados com 6-OHDA, pois observaram correlação direta significativa entre o número de células COX-2 positivas e a presença de movimentos involuntários anormais nos animais parkinsonianos. Ainda no mesmo trabalho, a COX-2 foi identificada principalmente em neurônios dopaminérgicos, visualizados através da co-localização de COX-2 e DARPP-32 no corpo estriado, e em neurônios colinérgicos, evidenciado pela co-localização de COX-2 e ChAT. Além disso, as células marcadas para COX-2 estavam próximas às aquelas marcadas para GFAP e OX-42, marcadores de astrócitos e micróglia, respectivamente. No nosso trabalho também observamos aumento da microgliose, da astrogliose e de células COX-2 positivas causados pela L-DOPA e o bloqueio do receptor P2X7 diminuiu essas alterações, apresentando efeito antiinflamatório.

A ativação do receptor P2X7 pelo ATP liberado de células lesionadas leva a formação de um poro na célula, causando saída de potássio. O efluxo de potássio induzido pelo ATP através do receptor P2X7 é importante para a maturação, síntese e liberação de IL-1 β pelos macrófagos e monócitos, etapa importante no desenvolvimento do processo inflamatório, que por sua vez aumenta a ativação de COX-2, aumentando a produção de mediadores inflamatórios (FERRARI *et al.*, 2006). Nossos resultados sugerem que a L-DOPA possui um efeito pró-inflamatório e este seja um dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA.

Outros mecanismos, além da inflamação parecem estar envolvidos na discinesia. Estudos demonstram potencial atividade pró-oxidante da L-DOPA, sugerindo que a mesma aumente o estresse oxidativo em modelos animais, aumentando o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ensaio de TBARS) que é utilizado para avaliar a peroxidação lipídica de células e tecidos (ALIREZAEI, 2015). Estudo realizado com 30 pacientes com DP demonstrou que o tratamento com L-DOPA aumenta a síntese e consumo de GSH através da quantificação da relação cisteína-glicina, demonstrando que a L-DOPA aumenta estresse oxidativo em pacientes com DP (MULLER *et al.*, 2016). Portanto, não podemos descartar o envolvimento do estresse oxidativo no desenvolvimento da discinesia.

Os mecanismos pelos quais o bloqueio do receptor P2X7, através do BBG, exerce efeito anti-discinético ainda não estão completamente elucidados, pois o modelo utilizado no

presente trabalho não induz a agregação de α -sinucleína, que está presente em outros modelos (FRANCARDO; CENCI, 2014). A agregação de α -sinucleína é um achado histopatológico importante e está presente em muitos pacientes com DP (WIRDEFELD *et al*, 2011). Além disso, o modelo experimental de DP induzido pela 6-OHDA não induz alterações genéticas, como por exemplo, o modelo da rotenona é capaz de induzir. Portanto, mais estudos são necessários para entendermos o papel dos receptores purinérgicos na discinesia induzida por L-DOPA.

Nossos dados sugerem que a neuroinflamação desempenha um papel importante no desenvolvimento da discinesia e que a L-DOPA, possivelmente, seja um indutor desta neuroinflamação. Além disso, a neuroinflamação induzida pela L-DOPA nos animais lesionados por 6-OHDA está relacionada, pelo menos parcialmente, com a ativação de receptores P2X7, visto que o bloqueio do mesmo é capaz de diminuir o desenvolvimento de AIMs nos animais tratados cronicamente com L-DOPA e diminuir a neuroinflamação através da diminuição da microgliose, astrogliose, de células COX-2 positivas e da expressão de IL-1 β . Não podemos descartar a participação de outras citocinas pró-inflamatórias, como o TNF α e prostaglandinas, na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA visto que não fizemos a mensuração destes parâmetros.

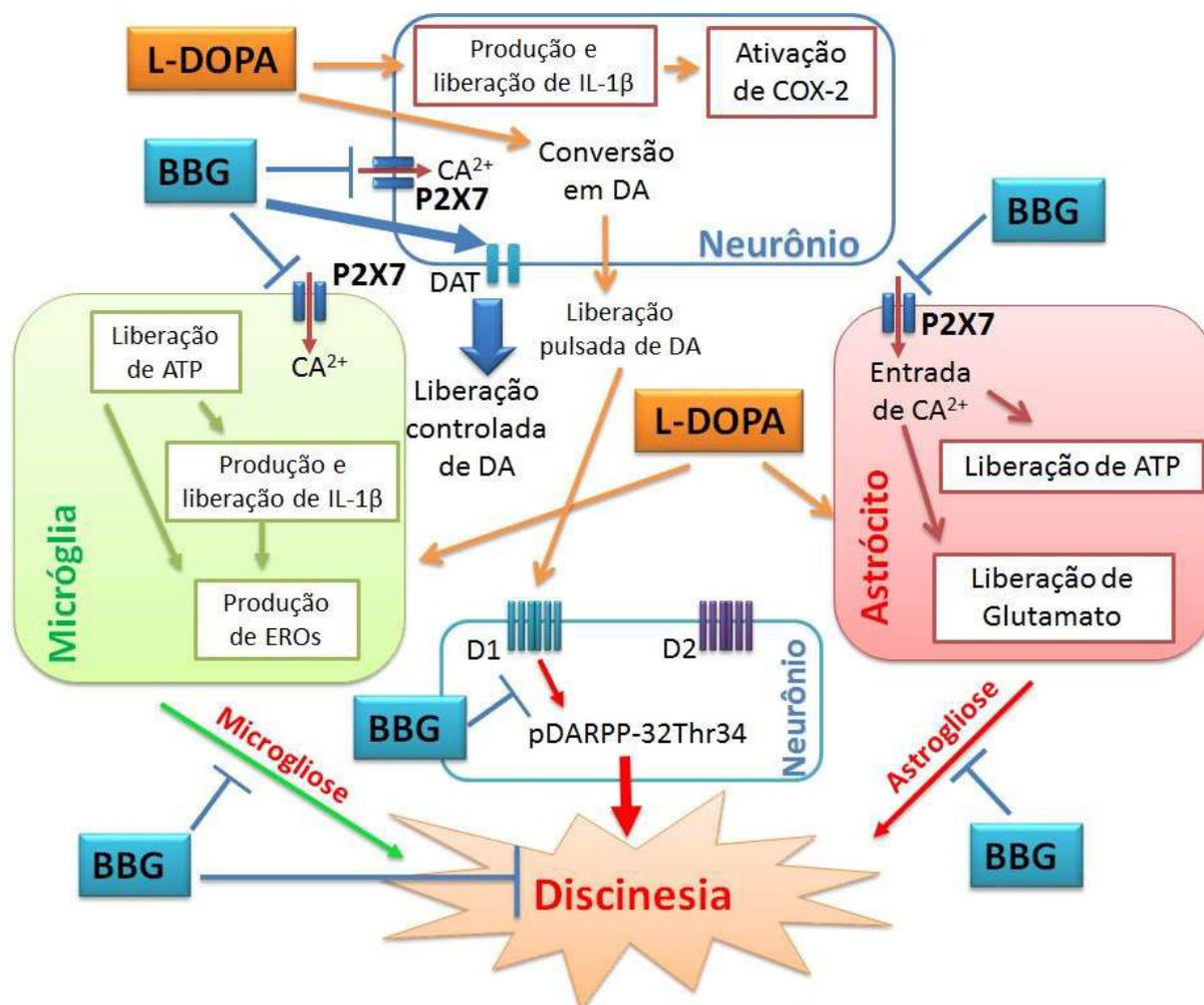
Outro mecanismo possivelmente responsável pelo efeito anti-discinético do BBG que não podemos deixar de salientar é o aumento do DAT no mesencéfalo nos animais parkinsonianos tratados com BBG. O aumento do DAT pelo BBG possivelmente está modulando a liberação de DA no corpo estriado, diminuindo a ativação da via direta dos circuitos dos núcleos da base, fato que é comprovado através da diminuição da expressão de receptores D1 e da proteína pDARPP-32Thr34 no corpo estriado dos animais parkinsonianos em nosso estudo. Nossos dados demonstram que a via direta está diminuída após o bloqueio do receptor P2X7 pelo BBG. Sendo assim, o presente trabalho demonstra a participação do sistema purinérgico, mais especificamente o receptor P2X7, no desenvolvimento da discinesia induzida por L-DOPA. Porém, mais estudos são necessários para compreender os mecanismos pelos quais o sistema purinérgico participa, não podendo descartar outras hipóteses, como alterações pós-sinápticas, ou ainda a participação de outros receptores purinérgicos.

7 CONCLUSÃO

O tratamento com o BBG, antagonista seletivo do receptor P2X7, levou a:

- A diminuição da discinesia induzida pela L-DOPA em animais submetidos à lesão intraestriatal pela 6-OHDA, um modelo experimental de DP;
- Não diminuição da degeneração neuronal induzida pela 6-OHDA, demonstrando assim que o BBG não possui ação neuroregenerativa, agindo apenas de modo neuroprotetor;
- O aumento dos níveis de DAT no mesencéfalo, o que provavelmente é um dos mecanismos associados ao seu efeito anti-discinético;
- A diminuição da ativação da via direta, através da diminuição da expressão do receptor dopaminérgico D1 e da ativação desta via devido à diminuição da relação pDARPP-32Thr34/pDARPP-32tot no corpo estriado;
- Não alteração da expressão de receptor dopaminérgico D2, o que demonstra que o efeito anti-discinético do BBG provavelmente não se dá através desta via;
- A diminuição da neuroinflamação através da diminuição da astrogliose, microgliose, da ativação de COX-2 e da expressão de IL-1 β induzidos pelo tratamento crônico com L-DOPA. A neuroinflamação possivelmente é um dos mecanismos pelos quais a L-DOPA induz a discinesia, sendo, portanto, um dos mecanismos pelo qual o BBG possui efeito anti-discinético.er

Figura 36. Modelo proposto para o envolvimento do receptor de purinas, P2X7, na fisiopatologia da discinesia induzida por L-DOPA em animais parkinsonianos.



A L-DOPA promove a ativação de micróglia e de astrócitos promovendo a liberação de mediadores inflamatórios, como IL-1 β . No neurônio promove a ativação de COX-2 com o aumento da inflamação e diminuição do DAT (transportador de dopamina), e aumento da ativação da via direta através da ativação dos receptores D1. O BBG (*brilliant blue G*), por sua vez, bloqueia o receptor de purinas P2X7, atenuando as ações da L-DOPA, diminuindo o desenvolvimento da discinesia.

REFERÊNCIAS

ABERCROMBIE, E.D.; BONATZ, A.E.; ZIGMOND, M.J. Effects of L-dopa on extracellular dopamine in striatum of normal and 6-hydroxydopamine-treated rats. **Brain Res.**, v. 525, n. 1, p. 36-44, 1990.

ALIREZAEI, M. Betaine protects cerebellum from oxidative stress following levodopa and benserazide administration in rats. **Iran J Basic Med Sci.**, v. 18, n. 10, p. 950-7, 2015.

ANDERSSON, M.; KONRADI, C.; CENCI, M.A. cAMP response element-binding protein is required for dopamine-dependent gene expression in the intact but not the dopamine-denervated striatum. **J Neurosci**, v. 21, p. 9930–9943, 2001.

ARAI, A.; TOMIYAMA, M.; KANNARI, K., et al. Reuptake of L-DOPA-derived extracellular DA in the striatum of a rodent model of Parkinson's disease via norepinephrine transporter. **Synapse.**, v. 62, p. 632- 635, 2008.

ARULKUMARAN, N.; UNWIN, R.J.; TAM, F.W. A potential therapeutic role for P2X7 receptor (P2X7R) antagonists in the treatment of inflammatory diseases. **Expert Opin Investig Drugs.**, v. 20, n. 7, p. 897-915, 2011.

BANATI, R.B.; DANIEL, S.E.; BLUNT, S. B. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v. 13, n. 2, p. 221-7, 1998.

BARNUM, C. J.; ESKOW, K. L.; DUPRE, K.; BLANDINO, P. JR.; DEAK, T.; BISHOP, C. 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, 2008.

BARTLETT, R.; SLUYTER, V.; WATSON, D.; SLUYTER, R.; YERBURY, J.J. P2X7 antagonism using Brilliant Blue G reduces body weight loss and prolongs survival in female SOD1G93A amyotrophic lateral sclerosis mice. **Peer J.**, v. 5, p. e3064, 2017.

BARTLETT, R.; STOKES, L.; SLUYTER, R. The P2X7 receptor channel: recent developments and the use of P2X7 antagonists in models of disease. **Pharmacol Rev.**, v. 66, n. 3, p. 638-75, 2014.

BASTIDE, M.F.; MEISSNER, W.G.; PICCONI, B.; FASANO, S.; FERNAGUT, P.O.; FEYDER, M.; et al. Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.**, v. 132, p. 96-168, 2015.

BEAL, M. F. Experimental models of Parkinson's disease. [Nat. Rev. Neurosci.](#), v. 2, p. 325-332, 2001.

BENNETT, M.V.; GARRÉ, J.M.; ORELLANA, J.A.; BUKAUSKAS, F.F.; NEDERGAARD, M.; SÁEZ, J.C. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. **Brain Res.**, v.1487, p. 3-15, 2012.

BETARBET, R.; SHERER, T.B.; GREENAMYRE, J.T. Animal models of Parkinson's disease. **Bioessays.**, v. 24, n. 4, p. 308-18, 2002.

BEZARD, E.; GROSS, C. E.; BROTHIE, J. M. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. **Trends Neurosci.** v. 26, p. 215–21, 2003.

BEZARD, E.; TRONCI, E.; PIOLI, E. Y., *et al.* Study of the antidyskinetic effect of eltopazine in animal models of levodopa-induced dyskinesia. **Mov Disord**, v. 28, p. 1088–1096, 2013.

BIDO, S.; MARTI, M.; MORARI, M. Amantadine attenuates levodopa-induced dyskinesia in mice and rats preventing the accompanying rise in nigral GABA levels. **J Neurochem.**, v. 118, n.6, p. 1043–1055, 2011.

BLANCHET, P. J.; GRONDIN, R.; BEDARD, P. J.; SHIOSAKI, K.; BRITTON, D. R. Dopamine D1 receptor desensitization profile in MPTP-lesioned primates. **Eur J Pharmacol.** Vol. 309(1), p. 13–20, 1996.

BLUM, D.; TORCH, S.; LAMBENG, N.; NISSOU, M.; BENABID, A. L.; SADOUL, R.; VERNA, J. M. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. **Prog. Neurobiol.** v. 65, p. 135–172, 2001.

BLUM-DEGEN, D.; MULLER, T.; KUHN, W.; GERLACH, M.; PRZUNTEK, H.; RIEDERER, P. Interleukin-1 beta and interleukin-6 are elevated in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's and de novo Parkinson's disease patients. **NeurosciLett.**, v. 202, n. 1–2, p. 17–20, 1995.

BORTOLANZA, M.; CAVALCANTI-KIWIATKOSKI, R.; PADOVAN-NETO, F. E.; DA-SILVA, C. A.; MITKOVSKI, M.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL-BEL, E. Glial activation is associated with L-DOPA induced dyskinesia and blocked by nitric oxide synthase inhibitor in a rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of disease.** v. 73, p. 377–387, 2015.

BORTOLANZA, M.; PADOVAN-NETO, F. E.; CAVALCANTI-KIWIATKOSKI, R.; SANTOS-PEREIRA, M.; MITKOVSKI, M.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL-BEL, E. Are cyclooxygenase-2 and nitric oxide involved in the dyskinesia of Parkinson's disease induced by L-DOPA? **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 370, p. 20140190, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Políticas de Saúde. Boletim Epidemiológico. Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.

BUCK, K.; FERGER, B. Comparison of intrastriatal administration of noradrenaline and L-DOPA on dyskinetic movements: a bilateral reverse in vivo microdialysis study in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. **Neuroscience**, v. 159, p. 16–20, 2009.

BURNSTOCK, G. Purinergic mechanisms broaden their sphere of influence. **Trends in neuroscience**, vol. 8, p. 5–6, 1985.

BURNSTOCK, G. Purinergic signalling and disorders of the central nervous system. **Nature Reviews/Drug Discovery**, vol. 7, p. 575–590, 2008.

BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. P2X receptors in health and disease. **Adv Pharmacol.**, v. 61, p. 333-72, 2011.

BURNSTOCK, G.; KNIGHT, G.E. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. **Int Rev Cytol.**, v. 240, p. 31-304, 2004.

CARMO, M. R. S.; MENEZES, A. P. F.; NUNES, A. C. L.; PLIÁSSOVA, A.; ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M.; CUNHA, R. A.; CANA, P. M.; ANDRADE, G. M. The P2X7 receptor antagonist Brilliant Blue G attenuates contralateral rotations in a rat model of parkinsonism through a combined control of synaptotoxicity, neurotoxicity and gliosis. **Neuropharmacology**, v. 81, p. 142-152, 2014.

CENCI, M.A.; LUNDBLAD, M. Post- versus presynaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **J Neurochem.**, v. 99, n. 2, p. 381-92, 2006.

CENCI, M.A.; OHLIN, K.E. Rodent models of treatment-induced motor complications in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 4, p. S13-7, 2009.

CHAPUIS, S.; OUCHCHANE, L.; METZ, O.; GERBAUD, L.; DURIF F. Impact of the motor complications of Parkinson's disease on the quality of life. **Mov Disord.**, v. 20, n. 2, p. 224-30, 2005.

CHEN, X.; HU, J.; JIANG, L.; XU, S.; ZHENG, B.; WANG, C.; ZHANG, J.; WEI, X.; CHANG, L.; WANG, Q. Brilliant Blue G improves cognition in an animal model of Alzheimer's disease and inhibits amyloid- β -induced loss of filopodia and dendrite spines in hippocampal neurons. **Neuroscience.**, v. 279, p. 94-101, 2014.

CHOI, Y .M.; JANG, J. Y.; JANG, M.; KIM, S. H. ; KANG, Y. K.; CHO, H.; CHUNG, S.; PARK, M. K. Modulation of firing activity by ATP in dopamine neurons of the rat substantianigra pars compacta. **Neuroscience**, v. 160, p. 587–595, 2009.

CONTI, M.M.; MEADOWS, S.M.; MELIKHOV-SOSIN, M.; LINDENBACH, D.; HALLMARK, J.; WERNER, D.F.; BISHOP, C. Monoamine transporter contributions to L-DOPA effects in hemi-parkinsonian rats. **Neuropharmacology.**, v. 110, n. Pt A, p. 125-34, 2016.

CONTI, M.M.; OSTOCK, C.Y.; LINDENBACH, D.; GOLDENBERG, A.A.; KAMPTON, E.; DELL'ISOLA, R.; KATZMAN, A.C.; BISHOP, C. Effects of prolonged selective serotonin reuptake inhibition on the development and expression of L-DOPA-induced dyskinesia in hemi-parkinsonian rats. **Neuropharmacology.**, v. 77, p.1-8, 2014.

CORIOLOANO, M.G.W.S.; SILVA, E.G.; FORTUNA, E.S.; ASANO, A.; MONTEIRO, D.; LINS, O.G. Epidemiological profile of patients with Parkinson's disease (PD) IN THE Clinical Hospital of Federal University of Pernambuco. **Neurobiologia**, v. 76, n. 1-2, p. 19-27, 2013.

CORVOL, J. C.; STUDLER, J. M.; SCHONN, J. S.; GIRAULT, J. A.; HERVÉ, D. Galpha(olf) is necessary for coupling D1 and A2a receptors to adenylyl cyclase in the striatum. **J Neurochem**, v. 76, p. 1585–1588, 2001.

CUI, G.; YANG, X.; WANG, X.; ZHANG, Z.; YUE, X.; SHI, H.; SHEN, X. Ranitidine reduced levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **Neuropsychiatr Dis Treat.**, v. 10, p.39-46, 2014.

DARMOPIŁ, S.; MARTIN, A. B.; DE DIEGO, I. R.; ARES, S.; MORATALLA, R. Genetic inactivation of dopamine D1 but not D2 receptors inhibits L-DOPA-induced dyskinesia and histone activation. **Biol. Psychiatry**, v. 66, p. 603–613, 2009.

DAUER W., PRZEDBORSKI S. Parkinson's Disease: Mechanisms and Models. **Neuron**, v. 39, p. 889-909, 2003.

DEL-BEL, E.; PADOVAN-NETO, F.E.; SZAWKA, R.E.; DA-SILVA, C.A.; RAISMAN-VOZARI, R.; ANSELMO-FRANCI, J.; ROMANO-DUTRA, A.C.; GUIMARAES, F.S. Counteraction by nitric oxide synthase inhibitor of neurochemical alterations of dopaminergic system in 6-OHDA-lesioned rats under L-DOPA treatment. **Neurotox Res.**, v. 25, n. 1, p. 33-44, 2014.

DEUMENS, R.; BLOKLAND, A.; PRICKAERTS, J. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. **Exp Neurol.**, v. 175, n. 2, p. 303-17, 2002.

DHALL, R.; KREITZMAN, D.L. Advances in levodopa therapy for Parkinson disease: Review of RYTARY (carbidopa and levodopa) clinical efficacy and safety. **Neurology.**, v. 5, n. 86, p. S13-24, 2016.

DI MONTE, D.A.; MCCORMACK, A.; PETZINGER, G.; JANSON, A.M.; QUIK, M.; LANGSTON WJ. Relationship among nigrostriatal denervation, parkinsonism, and dyskinesias in the MPTP primate model. **Mov Disord.**, v. 15, n. 3, p. 459-66, 2000.

DÍAZ-HERNANDEZ, M.; DEL PUERTO, A.; DÍAZ-HERNANDEZ, J.I.; DIEZ-ZAERA, M.; LUCAS, J.J.; GARRIDO, J.J.; MIRAS-PORTUGAL, M.T. Inhibition of the ATP-gated P2X7 receptor promotes axonal growth and branching in cultured hippocampal neurons. **J Cell Sci.**, v. 121, n. Pt 22, p. 3717-28, 2008.

DOO, A.; KIM, S.; HAHM, D.; YOO, H. H.; PARK, J.; LEE, H.; JEON, S.; KIM, J.; PARK, S.; PARK, H. GastrodiaelataBlume alleviates L-DOPA-induced dyskinesia by normalizing FosB e ERK activation in a 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease mouse model. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 107, 2014.

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, 2007.

EHARA, A.; UEDA, S. Application of Fluoro-Jade C in Acute and Chronic Neurodegeneration Models: Utilities and Staining Differences. **Acta Histochem Cytochem**, v. 42, n. 6, p. 171–179, 2009.

ELBAZ, A.; CARCAILLON, L.; KAB, S.; MOISAN, F. Epidemiology of Parkinson's disease. **RevueNeurologique.**, v. 172, n. 1, p. 14-26, 2015.

EMBORG, M. E. Evaluation of animal models of Parkinson's disease for neuroprotective strategies. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 139, p. 121–143, 2004.

FABBRINI, G.; BROTCHE, J.M.; GRANDAS, F.; NOMOTO, M.; GOETZ CG. Levodopa-induced dyskinesias. **Mov Disord.**, v. 22, n. 10, p. 1379-89, 2007.

FAHN, S. The spectrum of levodopa-induced dyskinesias. **Ann Neurol**, v. 47, p. S2–9–11, 2000.

FERRARI, D.; PIZZIRANI, C.; ADINOLFI, E.; LEMOLI, R. M.; CURTI, A.; IDZKO, M. et al. The P2X7 receptor: A key player in IL-1 processing and release. **J Immunol**, v. 176, p. 3877–3883, 2006;

FIorentini, C.; RIZZETTI, M.C.; BUSI, C.; BONTEMPI, S.; COLLO, G.; SPANO, P.; MISSALE, C. Loss of synaptic D1 dopamine/N-methyl-D-aspartate glutamate receptor complexes in L-DOPA-induced dyskinesia in the rat. **Mol Pharmacol.**, v. 69, n. 3, p. 805-12, 2006.

FIorentini, C.; SAVOIA, P.; SAVOLDI, D.; BARBON, A.; MISSALE, C. Persistent activation of the D1R/Shp-2/Erk1/2 pathway in L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-hydroxy-dopamine rat model of Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 54, p. 339–348, 2013.

FRANCARDO, V.; CENCI, M.A. Investigating the molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse. **Parkinsonism Relat Disord.**, v. 20, p. S20-2, 2014.

GARDONI, F.; PICCONI, B.; GHIGLIERI, V.; POLLI, F.; BAGETTA, V.; BERNARDI, G.; CATTABENI, F.; DI LUCA, M.; CALABRESI, P. A critical interaction between NR2B and MAGUK in L-DOPA induced dyskinesia. **J Neurosci.**, v. 26, n. 11, p. 2914-2922, 2006.

GERHARD, A.; PAVESE, N.; HOTTON, G.; TURKHEIMER, F.; ES, M.; HAMMERS, A.; EGGERT, K.; OERTEL, W.; BANATI, R.B.; BROOKS, D.J. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiol Dis.**, v. 21, n. 2, p. 404-12, 2006.

GERLACH, M.; RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **J Neural Transm**, v. 103, p. 987-1041, 1996.

GEVER, J.R.; COCKAYNE, D.A.; DILLON, M.P.; BURNSTOCK, G.; FORD, A.P. Pharmacology of P2X channels. **Pflugers Arch.**, v. 452, n. 5, p. 513-37, 2006.

GHADERY, C.; KOSHIMORI, Y.; COAKELEY, S.; HARRIS, M.; RUSJAN, P.; KIM, J.; HOULE, S.; STRAFELLA, A.P. Microglial activation in Parkinson's disease using [18F]-FEPPA. **J Neuroinflammation.**, v. 14, n. 1, p. 8, 2017.

GOLAN, David E. **Princípios de farmacologia:** a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009, 169 p.

GOMES, C.V.; KASTER, M.P.; TOMÉ, A.R.; AGOSTINHO, P.M.; CUNHA, R.A. Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. **Biochim Biophys Acta**, v. 1808, n. 5, p. 1380-99, 2011.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**. v. 294, p. 1024–1030, 2001.

GURIDI, J.; OBESO, J.A.; RODRIGUEZ-OROZ, M.C.; LOZANO, A.A.; MANRIQUE, M. L-dopa-induced dyskinesia and stereotactic surgery for Parkinson's disease. **Neurosurgery**., v. 62, n. 2, p. 311-23, 2008.

HALLETT, P.J.; DUNAH, A.W.; RAVENSCROFT, P.; ZHOU, S.; BEZARD, E.; CROSSMAN, A.R.; BROTCHE, J.M.; STANDAERT, D.G. Alterations of striatal NMDA receptor subunits associated with the development of dyskinesia in the MPTP-lesioned primate model of Parkinson's disease. **Neuropharmacology**., v. 48, n. 4, p. 503-16, 2005.

HELY, M. A.; MORRIS, J. G.; REID W. G.; TRAFFICANTE, R. Sydney Multicenter Study of Parkinson's disease: non-L-DOPA-responsive problems dominate at 15 years. **MovDisord**, v. 20, p. 190–199, 2005.

HEUMANN, R.; MORTALLA, R.; HERRERO, M. T.; CHAKRABARTY, K. *et al.*. Dyskinesia in Parkinson's disease: mechanisms and current non-pharmacological interventions. **J. Neurochem**. v. 130, p. 472–489, 2014.
histone activation. **Biol Psychiatry**. v. 66, n. 6, p. 603–13, 2009.

HUOT, P. L-DOPA-induced dyskinesia, is striatal dopamine depletion a requisite? **J Neurol Sci.**, v. 351, n. 1-2, p. 9-12, 2015.

HUOT, P.; JOHNSTON, T. H.; KOPRICH, J. B.; FOX, S. H.; BROTCHE, J. M. The pharmacology of L-DOPA-induced dyskinesia in Parkinson's disease. **Pharmacol rev.**, v. 65, p. 171–222, 2013.

IDERBERG, H.; MCCREARY, A.C.; VARNEY, M.A.; KLEVEN, M.S.; KOEK, W.; BARDIN, L.; DEPOORTÈRE, R.; CENCI, M.A.; NEWMAN-TANCREDI, A. NLX-112, a novel 5-HT1A receptor agonist for the treatment of L-DOPA-induced dyskinesia: Behavioral and neurochemical profile in rat. **Exp Neurol.**, v. 271, p. 335-50, 2015.

INOUE, K.; NAKAZAWA, K.; WATANO, T.; OHARA-IMAIZUMI, M.; FUJIMORI, K.; TAKANAKA, A. Dopamine receptor agonists and antagonists enhance ATP-activated currents. **Eur J Pharmacol**, v. 215, p. 321–324, 1992.

IRVANI, M. M.; JENNER, P. Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa-induced dyskinesia and their pharmacological manipulation. **J Neural Transm**. v. 118, p. 1661–1690, 2011.

JAGMAG, S.A.; TRIPATHI, N.; SHUKLA, S.D.; MAITI, S.; KHURANA, S. Evaluation of Models of Parkinson's Disease. **Front Neurosci.**, v. 9, p. 503, 1026.

- JENNER, P. M. Molecular mechanisms of L-DOPA-induced dyskinesia. **Nature Reviews**, v. 9, p. 665-677, 2008.
- JENNER, P. M. Wearing Off, dyskinesia, and the use of continuous drug delivery in Parkinson's disease. **NeurolClin**, v. 31, p. s17-35, 2013.
- JIMENES-URBIETA, H.; GAGO, B.; RIVA, P.; DELGADO-ALVARADO, M.; MARIN, C.; RODRIGUESZ-OROZ, M. C. Dyskinesia and impulse control disorders in Parkinson's disease: From pathogenesis to potential therapeutic approaches. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 56, p. 294-314. 2015.
- KATZENSCHLAGER, R.; LEES, A.J. Treatment of Parkinson's disease: levodopa as the first choice. **J Neurol.**, v. 249, p. II19-24, 2002.
- KEMPURAJ, D.; THANGAVEL, R.; NATTERU, P.A.; SELVAKUMAR, G.P.; SAEED, D.; ZAHOOR, H.; ZAHEER, S.; IYER, S.S.; ZAHEER, A. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. **J Neurol Neurosurg Spine.**, v. 1, n. 1, p. 1003, 2016.
- KO, W.K.; CAMUS, S.M.; LI, Q.; YANG, J.; MCGUIRE, S.; PIOLI, E.Y.; BEZARD, E. An evaluation of istradefylline treatment on Parkinsonian motor and cognitive deficits in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated macaque models. **Neuropharmacology**, v. 110, n. Pt A, p. 48-58, 2016.
- KRAEMMER, J.; KOVACS, G.; PERJU-DUMBRAVA, L.; PIRKER, S.; TRAUB-WEIDINGER, T.; PIRKER, W. Correlation of striatal dopamine transporter imaging with post mortem substantia nigra cell counts. **Mov.Disord.**, v. 29, p. 1767-1773, 2014.
- KRUGEL, U.; KITTNER, H.; FRANKE, H.; ILLES, P. Purinergic modulation of neuronal activity in the mesolimbic dopaminergic system in vivo. **Synapse**, v. 47, p. 134-142, 2003.
- KRUGEL, U.; KITTNER, H.; FRANKE, H.; ILLES, P. Stimulation of P2 receptors in the ventral tegmental area enhances dopaminergic mechanisms in vivo. **Neuropharmacology**, v. 40, p. 1084-1093, 2001.
- KRUGEL, U.; SPIES, O.; REGENTHAL, R.; ILLES, P.; KITTNER, H. P2 receptors are involved in the mediation of motivation-related behavior. **PurinergicSignal.**, v. 1, p. 21-29, 2004.
- LANG, A.; LOZANO, A.M. Parkinson's disease. First of two parts. **NEnglJMed**, v. 339, p. 1044-1053, 1998.
- LEE, H.G.; WON, S.M.; GWAG, B.J.; LEE, Y.B. Microglial P2X7 receptor expression is accompanied by neuronal damage in the cerebral cortex of the APPs we/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. **Exp.Mol.Med.**, v.43, p. 7-14, 2011.
- LEENTJENS, A.F. The role of dopamine agonists in the treatment of depression in patients with Parkinson's disease: a systematic review. **Drugs.**, v.71, n. 3, p. 273-86, 2011.
- LEVY, O. A.; MALAGELADA, C.; GREENE, L. A. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. **Apoptosis**, v. 14, p. 478-500.

2009.

LEWITT, P.A.; FAHN, S. Levodopa therapy for Parkinson disease: A look backward and forward. **Neurology.**, v. 86, p. S3-12, 2016.

LIMA, L.O.; CARDOSO, F.; TEIXEIRA-SALMELA, L.F.; RODRIGUES-DE-PAULA, F. Work and power reduced in L-dopa naïve patients in the early-stages of Parkinson's disease. **Arq Neuropsiquiatr.**, v.74, n. 4, p. 287-92, 2016.

LOTIA, M.; JANKOVIC, J. New and emerging medical therapies in Parkinson's disease. **Expert Opin Pharmacother.**, v.17, n. 7, p. 895-909, 2016.

LUNDBLAD, M.; USIELLO, A.; CARTA, M.; HAKANSSON, K.; FISONE, G.; CENCI, M. A. Pharmacological validation of a mouse model of L-DOPA-induced dyskinesia. **Exp Neurol.** v. 194, n. 1, p. 66–75, 2005.

LUNDBLAD, M.; ANDERSSON, M.; WINKLER, C.; KIRIK, D.; WIERUP, N.; CENCI, M. A. Pharmacological validation of behavioural measures of akinesia and dyskinesia in a rat model of Parkinson's disease. **European Journal of Neuroscience.** v.15, p. 120-132, 2002.

MAEDA, T.; NAGATA, K.; YOSHIDA, Y.; KANNARI, K. Serotonergic hyperinnervation into the dopaminergic denervated striatum compensates for dopamine conversion from exogenously administered L-DOPA. **Brain Res.**, v. 1046, n. 1-2, p. 230-233, 2005.

MAGRINELLI, F.; PICELLI, A.; TOCCO, P.; FEDERICO, A.; RONCARI, L.; SMANIA, N.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Pathophysiology of Motor Dysfunction in Parkinson's Disease as the Rationale for Drug Treatment and Rehabilitation. **Parkinsons Dis.**, 2016. doi: 10.1155/2016/9832839.

MCGEER, P.L.; ITAGAKI, S.; BOYES, B.E.; MCGEER, E.G. 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. 1285-91, 1988.

MENEZES, Ana Paula Fontenele. **Efeitos da curcumina e do resveratrol em ratos com parkinsonismo experimental induzido por 6-hidroxidopamina: um estudo comportamental e neuroquímico.** 2012. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

MIRZA, B.; HADBERG, H.; THOMSEN, P.; MOOS, T. The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v.95, n. 2, p. 425-32, 2000.

MIZUNO, Y. Genetics of Parkinson's disease. **Biomed Pharmacother.** v. 53, p. 109-116, 1999.

MOGI, M.; HARADA, M.; KONDO, T.; RIEDERER, P.; INAGAKI, H.; MINAMI, M.; NAGATSU, T. Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci Lett.**, v. 180, n. 2, p. 147–50, 1994.

MORIGUCHI, S.; YABUKI, Y.; FUKUNAGA, K. Reduced calcium/calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus is associated with impaired cognitive function in MPTP-treated mice. **Journal of Neurochemistry**. v. 120, p.541-551, 2012.

MÜLLER, T.; TROMMER, I.; MUHLACK, S.; MUELLER, B.K. Levodopa increases oxidative stress and repulsive guidance molecule A levels: a pilot study in patients with Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**, v. 123, n. 4, p. 401-6, 2016.

NADJAR, A.; GERFEN, C.R.; BEZARD, E. Priming for l-dopa-induced dyskinesia in Parkinson's disease: a feature inherent to the treatment or the disease? **Prog.Neurobiol.**, v. 87, p. 1–9, 2009.

NAGATSU, T.; SAWADA, M. Biochemistry of postmortem brains in Parkinson's disease: historical overview and future prospects. **J Neural Transm Suppl**. v.72, p. 113-20, 2007.

NEVES, K.R.; NOBRE, H.V. JR.; LEAL, L.K.; DE ANDRADE, G.M.; BRITO, G.A.; VIANA, G.S. Pentoxifylline Neuroprotective Effects Are Possibly Related to Its Anti-Inflammatory and TNF-Alpha Inhibitory Properties, in the 6-OHDA Model of Parkinson's Disease. **Parkinsons Dis.**, v. 2015, p. 108179, 2015.

NUTT, J. G.; GUNZLER, S.A.; KIRCHHOFF, T.; *et al.* Effects of a NR2B selective NMDA glutamate antagonist, CP-101,606, on dyskinesia and parkinsonism. **Movdisord**. v. 23, n. 13, p. 1860–1866, 2008.

OUCHI, Y.; YOSHIKAWA, E.; SEKINE, Y.; FUTATSUBASHI, M.; KANNO, T.; OGUSU, T.; TORIZUKA, T. Microglial activation and dopamine terminal loss in early Parkinson's disease. **Ann Neurol.**, v. 57, n. 2, p. 168-75, 2005.

PADOVAN-NETO, F. E.; ECHEVERRY, M. B.; TUMAS, V.; DEL-BEL, E. A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesia in a rodent model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 159, p. 927-935, 2009.

PADOVAN-NETO, F.E.; FERREIRA, N.R.; DE OLIVEIRA-TAVARES, D.; DE AGUIAR, D.; DA SILVA, C.A.; RAISMAN-VOZARI, R.; DEL BEL, E. Anti-dyskinetic effect of the neuronal nitric oxide synthase inhibitor is linked to decrease of FosB/deltaFosB expression. **Neurosci Lett.**, v. 541, p. 126-31, 2013.

PAL, R.; MIRANDA, M.; NARAYAN, M. Nitrosative stress-induced Parkinsonian Lewylike aggregates prevented through polyphenolic phytochemical analog intervention. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 404, p. 324–329. 2011.

PALERMO, S.; BASTOS, I. C.C.; MENDES, M.F.X.; TAVARES, E.F.T.; SANTOS, D.C.L.; RIBEIRO, A.F. C. Avaliação e intervenção fonoaudiológica na doença de Parkinson. Análise clínica-epidemiológica de 32 pacientes. **Rev Bras Neurol**, v. 45, n. 4, p. 17-24, 2009.

PARK, B.; YANG, J.; YUN, N.; CHOE, K.M.; JIN, B.K.; OH, Y.J. Proteomic analysis of expression and protein interactions in a 6-hydroxydopamine-induced rat brain lesion model. **Neurochem Int.**, v. 57, n. 1, p. 16-32, 2010.

PAVÓN, N.; MARTÍN, A.B.; MENDIALDUA, A.; MORATALLA, R. ERK phosphorylation and FosB expression are associated with L-DOPA-induced dyskinesia in hemiparkinsonian mice. **Biol Psychiatry**, v. 59, p. 64–74, 2006.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, London, 1986. In press.

PÉCHEVIS, M.; CLARKE, C. E.; VIEREGGE, P.; KHOSHNOOD, B.; DESCHASEAUX-VOINET, C.; BERDEAUX, G.; ZIEGLER, M. Trial Study Group. Effects of dyskinesias in Parkinson's disease on quality of life and health-related costs: a prospective. **European study. Eur J Neurol**, v. 12, p. 956–963, 2005.

PERESE, D. A.; ULMAN, J.; VIOLA, J.; EWING, S. E.; BANKIEWICZ, K. S. A 6-hydroxydopamine-induced selective parkinsonian rat model. **Brain Research**, v. 494, p. 285–293, 1989.

PICCONI, B.; CENTONZE, D.; HÅKANSSON, K.; BERNARDI, G.; GREENGARD, P.; FISONE, G.; CENCI, M. A.; CALABRESI, P. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Neurosci.**, v. 6, n. 5, p. 501–506, 2003..

PICCONI, B.; CENTONZE, D.; HÅKANSSON, K.; et al. Loss of bidirectional striatal synaptic plasticity in L-DOPA-induced dyskinesia. **Nat Neurosci.** v. 6, p. 501–506, 2003.

PINNA, A.; KO, W. K.; COSTA, G.; TRONCI, E.; FIDALGO, C.; SIMOLA, N.; LI, Q.; TABRIZI, M. A.; BEZARD, E.; CARTA, M.; MORELLI, M. Antidyskinetic effect of A2A and 5HT1A/1B receptor ligands in two animal models of Parkinson's disease. **Mov Disord.**, v. 31, n. 4, p. 501–511, 2016.

PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. The prevalence of Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **Mov Disord**, v. 29, n. 13, p. 1583–90, 2014.

PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of nigral cell death in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 11, p. 3–7, 2005.

PUCHAŁOWICZ, K.; TARNOWSKI, M.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; CHLUBEK, D.; DZIEDZIEJKO, V. P2X and P2Y receptors—role in the pathophysiology of the nervous system. **Int J Mol Sci.**, v. 15, n. 12, p. 23672–704, 2014.

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharmacol Rev.**, v. 50, n. 3, p. 413–92, 1998.

REN, T.; YANG, X.; WU, N.; CAI, Y.; LIU, Z.; YUAN, W. Sustained-release formulation of levodopa methyl ester/benserazide for prolonged suppressing dyskinesia expression in 6-OHDA-lesioned rats. **Neurosci Lett.** v. 502, p. 117–122, 2011.

RINGENDAHL, H.; SIERLA, T. Freezing phenomenon in Parkinson disease. **Fortschr**

Neurol Psychiatr., v. 65, n. 10, p. 435-45, 1997.

ROBELET, S.; MELON, C.; GUILLET, B.; SALIN, P.; KERKERIAN-LE, G. L. Chronic LDOPA treatment increases extracellular glutamate levels and GLT1 expression in the basal ganglia in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 20, p. 1255–1266, 2004.

RODRIGUES, R.J.; TOMÉ, A.R.; CUNHA, R.A. ATP as a multi-target danger signal in the brain. **Front Neurosci.**, v. 9, p. 148, 2015.

ROSIN, D.L.; HETTINGER, B.D.; LEE, A.; LINDEN, J. Anatomy of adenosine A2A receptors in brain: morphological substrates for integration of striatal function. **Neurology**, v.61, n. 11, p. S12-S18, 2003.

RYU, J.K.; MCLARNON, J.G. Block of purinergic P2X7 receptor is neuroprotective in an animal model of Alzheimer's disease. **Neuroreport**, v. 19, p. 1715–1719, 2008.

SANTINI, E.; VALJENT, E.; USIELLO, A.; CARTA, M.; BORGKVIST, A.; GIRAULT, J. A.; HERVE, D.; GREENGARD, P.; FISONE, G. Critical involvement of AMPK and DARPP-32 and extracellular signal-regulated protein kinase signaling in L-DOPA-induced dyskinesia. **J. Neurosci.** v. 27, p. 6995–7005, 2007.

SEBASTIANUTTO, I.; MASLAVA, N.; HOPKINS, C. R.; CENCI, M. A. Validation of an improved scale for rating L-DOPA-induced dyskinesia in the mouse and effects of specific dopamine receptor antagonists. **Neurobiology of Disease**. v. 96, p. 156–170. 2016.

SCHMUED, L.C.; STOWERS, C.C.; SCALLET, A.C.; XU, L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. **Brain Res.**, v. 1035, n. 1, p. 24-31, 2005.

SCHOBER, A. Classic toxin-induced animal models of Parkinson's disease: 6-OHDA and MPTP. **Cell Tissue Res.** v. 318, p.215–224. 2004.

SKAPER, S.D.; FACCI, L.; CULBERT, A.; CHESSELL, I.; DAVIS, J.B.; RICHARDSON, J.C. P2X7 receptors on microglial cells mediate toxicity to cortical neurons in vitro. **Society for Neuroscience**, v.54, n. 3, p. 234-42, 2005.

SOLÍS, O.; GARCIA-MONTES, J.R.; GONZÁLEZ-GRANILLO, A.; XU, M.; MORATALLA, R. Dopamine D3 Receptor Modulates l-DOPA-Induced Dyskinesia by Targeting D1 Receptor-Mediated Striatal Signaling. **Cereb Cortex.**, v. 27, n. 1, p. 435-446, 2017.

SONG, L.; ZHANG, Z.; HU, R.; CHENG, J.; LI, L.; FAN, Q.; WU, N.; GAN, J.; ZHOU, M.; LIU, Z. Targeting the D1-N-methyl-D-aspartate receptor complex reduces L-dopa-induced dyskinesia in 6-hydroxydopamine-lesioned Parkinson's rats. **Drug Des Devel Ther.**, v. 10, p. 547-55, 2016.

SPERLÁGH, B.; ILLES, P. P2X7 receptor: an emerging target in central nervous system diseases. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 35, n. 10, p. 537-47, 2014.

- SPERLÁGH, B.; ILLES, P. Supersensitivity of P2X receptors in cerebrocortical cell cultures after in vitro ischemia. **J Neurochem**, v. 95, n. 5, p. 1421-37, 2005.
- STAMFORD, J.; SCHELLER, D.; JENNER, P. Parkinson's Inside Out. **J Parkinsons Dis.**, v. 6, n. 1, p. 65-6, 2016.
- STOCCHI, F.; TAGLIATI, M.; OLANOW, C. W. Treatment of levodopa induced motor complications. **MovDisord**, v. 23, n. 3, p. S599–S612, 2008.
- STOOF, J.C.; KEBABIAN, J.W. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. **Nature.**, v. 294, n. 5839, p. 366-368, 1981.
- TEIXEIRA, M.D.; SOUZA, C.M.; MENEZES, A.P.; CARMO, M.R.; FONTELES, A.A.; GURGEL, J.P.; LIMA, F.A.; VIANA, G.S.; ANDRADE, G.M. Catechin attenuates behavioral neurotoxicity induced by 6-OHDA in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 110, p. 1-7, 2013.
- TRONCI, E.; FIDALGO, C.; ZIANNI, E.; COLLU, M.; STANCAMPIANO, R.; MORELLI, M.; GARDONI, F.; CARTA, M. Effect of memantine on L-DOPA-induced dyskinesia in the 6-OHDA-lesioned rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience.**, v. 265, p. 245-52, 2014.
- TRONCI, E.; LISCI, C.; STANCAMPIANO, R.; FIDALGO, C.; COLLU, M.; DEVOTO, P.; CARTA, M. 5-Hydroxy-tryptophan for the treatment of L-DOPA induced dyskinesia in the rat Parkinson's disease model. **Neurobiology of Disease.** v. 60, p. 108–114, 2013.
- TYSNES, O.B.; STORSTEIN, A.; Epidemiology of Parkinson's disease. **J Neural Transm (Vienna)**. 2017. doi: 10.1007/s00702-017-1686-y.
- UCHIDA, S.; TASHIRO, T.; KAWAI-UCHIDA, M.; MORI, A.; JENNER, P.; KANDA, T. Adenosine A_{2A}-receptor antagonist istradefylline enhances the motor response of L-DOPA without worsening dyskinesia in MPTP-treated common marmosets. **J. Pharmacol.Sci.**, v. 124, n. 4, p. 480-485, 2014.
- UNGERSTEDT U. 6-Hydroxy-dopamine induced degeneration of central monoamine neurons. **Eur J Pharmacol.** v. 5, p.107–110, 1968.
- WANG, Y.C.; CUI, Y.; CUI, J.Z.; SUN, L.Q.; CUI, C.M.; ZHANG, H.A.; ZHU, H.X.; LI, R.; TIAN, Y.X.; GAO, J.L. Neuroprotective effects of brilliant blue G on the brain following traumatic brain injury in rats. **Mol Med Rep.**, v. 12, n. 2, p. 2149-54, 2015.
- WICTORIN, K.; WIDNER, H. Memantine and reduced time with dyskinesia in Parkinson's Disease. **Acta Neurol Scand.**, v. 133, n. 5, p. 355-60, 2016.
- WIRKNER, K.; KÖFALVI, A.; FISCHER, W.; GÜNTHER, A.; FRANKE, H.; GRÖGER-ARNDT, H.; NÖRENBERG, W.; MADARÁSZ, E.; VIZI, E.S.; SCHNEIDER, D.; XIONG, Y.; ZHANG, Y.; IQBAL, J.; KE, M.; WANG, Y.; LI, Y.; QING, H.; DENG, Y.G *et al.*. Differential expression of synaptic proteins in unilateral 6-OHDA lesioned rat model-A comparative proteomics approach. **Proteomics.**, v. 14, n.15, p. 1808-1819, 2014.

YANG, X.; ZHENG, R.; CAI, Y.; LIAO, M.; YUAN, W.; LIU, Z. Controlled-release levodopa methyl ester/benserazide-loaded nanoparticles ameliorate levodopa-induced dyskinesia in rats. **Int J Nanomedicine.**, v. 7, p. 2077-86, 2012.

YOU DIM, M.B.; EDMONDSON, D.; TIPTON, K.F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nat Rev Neurosci.**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006.

ZHANG, Y. X.; YAMASHITA, H.; OHSHITA, T.; SAWAMOTO, N.; NAKAMURA, S. ATP increases extracellular dopamine level through stimulation of P2Y purinoceptors in the rat striatum. **Brain Res.**, v. 691, p. 205–212, 1995.

ZHANG, Y.; PATERSON, W.G. Excitatory purinergic neurotransmission in smooth muscle of guinea-pig [corrected] taenia caeci. **J Physiol.**, v. 563, n. Pt 3, p. 855-65, 2005.

ZHOU, M. Z.; LIU, Z. G.; GAN, J.; CHEN, W.; LU, L. X.; WU, J. Y. Neuropsychiatric problems in patients with Parkinson's disease. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi.**, v. 88, n. 21, p. 1442-5, 2008.

ZHUANG, X., BELLUSCIO, L., HEN, R. G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. **J Neurosci.**, v. 20, n. 16, p. 91, 2000.

ANEXO A – DECLARAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL DA UFC



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza – CE

DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação nº 107/2014, sobre o projeto intitulado: “Estudo do efeito do Brilliant Blue G sobre a discinesia tardia induzida por L-DOPA em animais com parkinsonismo experimental”, de responsabilidade da Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA - em reunião realizada em 26 de março de 2015.

Fortaleza, 27 de março de 2015

Assinatura manuscrita de Rodrigo Siqueira.

Prof. Dr. Rodrigo Siqueira

Coordenador da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Siape: 1520734