

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



Juliana Neto Mendes de Moura

**O envolvimento da SUMOilação nos efeitos neuroprotetores da cafeína
na doença de Parkinson**

Florianópolis – SC

2021

Juliana Neto Mendes de Moura

**O envolvimento da SUMOilação nos efeitos neuroprotetores da cafeína
na doença de Parkinson**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Rui Daniel Prediger, Dr.

Coorientadora: Profa. Helena Cimarosti, Dra.

Florianópolis – SC

2021

Juliana Neto Mendes de Moura

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moura, Juliana

O envolvimento da SUMOilação nos efeitos neuroprotetores da cafeína na doença de Parkinson / Juliana Moura ; orientador, Rui Daniel Prediger, coorientador, Helena Cimarosti, 2021.

58 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Cafeína. 3. SUMO. 4. 6-OHDA. 5. A2AR. I. Prediger, Rui Daniel . II. Cimarosti, Helena. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Juliana Neto Mendes de Moura

**O envolvimento da SUMOilação nos efeitos neuroprotetores da cafeína
na doença de Parkinson**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª. Roselia Maria Spanevello, Dra.
Universidade Federal de Pelotas

Prof. Alfeu Zanotto Filho, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Rui Daniel Prediger, Dr.
Orientador

Florianópolis – SC

2021

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família, que sempre me deu todo suporte financeiro e emocional que pôde para que eu chegasse até aqui. Todas as minhas conquistas são de vocês também!

Agradeço imensamente aos amigos que também são família, aos de longa e nem tão longa data, mas que de alguma forma estiveram comigo durante esse processo. Obrigada por serem ombro, ouvidos e auxiliares em tantas coisas, esta dissertação não existiria sem o apoio de cada um de vocês.

Não tenho palavras para agradecer ao meu grupo de pesquisa, o LEXDON, e a todos integrantes que me acompanharam nessa jornada. A premissa é verdadeira: não se faz ciência sozinho! Obrigada pelo ambiente incrível de trabalho que construímos juntos, por todas as trocas e aprendizados, tanto científicos quanto de vida. Levo cada um no meu coração!

Gostaria de fazer um agradecimento especial a Nai, antiga pós-doc do nosso grupo, e quem se dedicou com tanto carinho a me ensinar, do zero, toda parte experimental deste trabalho. Obrigada por toda paciência e disposição, por ter sido uma excelente professora e maravilhosa parceira de experimentos!

Agradeço também ao professor Rui Daniel Prediger, foi um privilégio ser sua orientada, e mesmo que por pouco tempo, ter aprendido tanto. Obrigada por toda dedicação, principalmente na elaboração desta dissertação, e por sempre resolver tudo que parecia um grande problema, de forma tão rápida e prática. Só tenho a agradecer por toda a liberdade, com orientação, que tive desde o início do mestrado até o fim.

Aproveito para agradecer a minha co-orientadora, profa. Helena Cimarosti, que se fez tão presente durante todo o período do mestrado e com quem tive o prazer de aprender muito também. Obrigada por acompanhar e me ensinar desde os experimentos até o estágio em docência e a elaboração do meu primeiro artigo.

E por fim, a todos colaboradores diretos desse trabalho, como meus colegas de segunda casa, Ericks e Gabriel, que foram ótimos parceiros de experimento e que tiravam seus tempos para me auxiliar em tudo que eu precisava. Ao laboratório da profa. Carla Tasca, ao qual agradeço imensamente, tanto a ela quanto aos seus orientandos, por cederem o espaço e materiais para que eu pudesse aprender e executar o desenho experimental deste estudo. Ao laboratório do Prof. Jamil Assreuy, que me socorreu algumas vezes com materiais, e por serem tão solícitos sempre para ajudar no que podiam.

Para meus Avós!

RESUMO

Em virtude do envelhecimento populacional, existe atualmente um aumento na incidência e relevância das doenças neurodegenerativas, como a doença de Parkinson (DP). Dentre os tratamentos farmacológicos para a DP, a reposição dopaminérgica permanece até os dias atuais como o tratamento padrão ouro. Entretanto, uma grande limitação é que após o tratamento crônico com a L-DOPA (fármaco precursor da síntese de dopamina), ocorrem efeitos indesejados numa parcela significativa dos pacientes. Na busca por terapias preventivas e neuroprotetoras para a DP, estudos epidemiológicos e experimentais vêm demonstrando o potencial neuroprotetor da cafeína, além de apresentar efeitos positivos sobre os sintomas motores e não motores na DP. Entretanto, ainda permanece pouco esclarecido por quais mecanismos a cafeína exerce seus efeitos neuroprotetores na doença de Parkinson. O objetivo principal do presente estudo foi avançar o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na neuroproteção exercida pela cafeína na doença de Parkinson, com ênfase no envolvimento da SUMOilação, uma modificação pós-traducional (MPT) que tem sido implicada em diversas doenças neurodegenerativas, incluindo a DP. No primeiro bloco avaliou-se o potencial efeito neuroprotetor de diferentes concentrações de cafeína (30, 60 e 100 μM) em fatias de estriado expostas à neurotoxina 6-OHDA (100 μM) utilizando-se o teste de viabilidade celular MTT. Os resultados indicaram que a 6-OHDA reduziu a viabilidade celular nas fatias de estriado e que este efeito foi prevenido pela co-incubação com a cafeína (concentrações de 30 e 60 μM). Devido às restrições impostas pela pandemia da COVID-19, o segundo bloco desse trabalho, cujo objetivo foi investigar o envolvimento da SUMOilação no efeito neuroprotetor da cafeína, foi explorado por meio de resultados prévios obtidos *in silico* e através de uma revisão da literatura. Por meio do *software* GPS-SUMO foram analisados sítios de ligação a SUMO (SIMs) nos receptores A2A para adenosina. Os resultados obtidos por esta análise indicaram a presença de sítios preditos de SIMs na sequência aminoacídica nos genes codificantes para o receptor A2A de humanos, ratos e camundongos. A revisão da literatura buscou esclarecer os mecanismos moleculares clássicos associados a neuroproteção conferida pela cafeína na DP, e elucidar o possível envolvimento da SUMOilação de proteínas nos efeitos neuroprotetores da cafeína. Em conclusão, a cafeína protegeu contra a perda da viabilidade celular no modelo *in vitro* de 6-OHDA no estriado, não sendo possível avançar experimentalmente na elucidação dos mecanismos neuroprotetores da cafeína. Entretanto, as evidências obtidas nos estudos *in silico* e na revisão da literatura indicaram que a SUMOilação de proteínas representa um potencial mecanismo neuroprotetor da cafeína na DP.

Palavras-chaves: Doença de Parkinson; Neuroproteção; Cafeína; 6-OHDA; SUMO; A2A

ABSTRACT

Due to population aging, there is currently an increase in the incidence of neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease (PD). Among the pharmacological treatments for PD, dopaminergic alteration remains nowadays as the gold standard treatment. However, a major limitation is that after chronic treatment with L-DOPA (a precursor to dopamine), diverse side effects occur in a significant number of patients. In the search for preventive and neuroprotective therapies for PD, epidemiological and experimental studies have pointed the neuroprotective potential of caffeine, in addition to its positive effects on motor and non-motor symptoms in PD. However, it remains unclear by which mechanisms caffeine exerts its neuroprotective effects in PD. The main objective of the present study was to advance the knowledge of the molecular mechanisms involved in the neuroprotection exerted by caffeine in PD, with an emphasis on the involvement of SUMOylation, a post-translational modification (PTM) that has been implicated in several neurodegenerative diseases, including DP. Firstly, the potential neuroprotective effect of different caffeine concentrations (30, 60 and 100 μM) in striatal slices exposed to neurotoxin 6-OHDA (100 μM) was evaluated using the MTT cell viability test. The results indicated that 6-OHDA reduced cell viability in striatal cells and that this effect was prevented by co-incubation with caffeine (30 and 60 μM). Mandatory to the restrictions imposed by the COVID-19 pandemic, the second block of this work, which sought to investigate the involvement of SUMOylation in the neuroprotective effect of caffeine, was explored through previous results used *in silico* and through a literature review. Using the GPS-SUMO software, SUMO binding sites (SIMs) on adenosine A2A receptors were analyzed. The results obtained by this analysis indicated the presence of predicted SIMs sites in the amino acid sequence in genes coding for the A2A receptor of humans, rats and mice. In the literature review, we sought to clarify the classical molecular mechanisms associated with neuroprotection conferred by caffeine in PD, and to elucidate the possible involvement of protein SUMOylation in the neuroprotective effects of caffeine. In conclusion, caffeine protected against the loss of cell viability in the *in vitro* model of 6-OHDA in the striatum, but it was not possible to elucidate the neuroprotective mechanisms of caffeine. However, evidence from *in silico* studies and previous findings from literature indicates that protein SUMOylation is a potential neuroprotective mechanism of caffeine in PD.

Keywords: Parkinson's disease; Neuroprotection; Caffeine; 6-OHDA; SUMO; A2AR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de SUMOilação	21
Figura 2: Mecanismo de ação da 6-OHDA	23
Figura 3: Desenho experimental.....	28
Figura 4: MTT estriado.....	30
Figura 5: Complexo Heterotretâmero A2AR-D2-AC5	37
Figura 6: Mecanismos clássicos associados a neuroproteção da cafeína.....	39
Figura 7: Identificação dos sítios preditos de SUMO-interaction motifs (SIMs) nos genes codificantes para A2A	42
Figura 8: Alvos em comum para neuroproteção entre SUMOilação e cafeína na DP	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA - 6-hidroxidopamina
A2AR - receptor A2A
AC5 - efetor adenilato ciclase tipo 5
D2R - receptor D2
DAT- transportador de dopamina
DMEM - meio celular nutritivo
DMSO - dimetil sulfóxido
DO - densidade óptica
DP - Doença de Parkinson
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
FDA - *Food and Drug Administration*
Formazan - {E,Z- 1-(4,5-dimetilazol-2-yl)-1,3-difenilformazan
GPCRs - receptores acoplados à proteína G
GSH - glutationa
H₂O₂ - peróxido de hidrogênio
i.p. - intraperitoneal
IDHs - isocitrato desidrogenases
IL-1 β - interleucina 1 β
LPS - lipopolissacarídeo de endotoxina bacteriana
MAO-B - monoamina oxidase-B
MPT - modificação pós-traducional
MPTP - 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MTT - brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium
NADH - nicotinamida adenina dinucleotídeo
NOS2 - óxido nítrico sintase do tipo 2
Nrf2 - fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2
PGC-1 - coativador-1 do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma
SENPs - SUMO proteases
SIMs - motivos de interação SUMO
SNC – Sistema Nervoso Central
SNpc – substância negra pars compacta

SUMO - *small ubiquitin-like modifier*

TDAH - transtorno de déficit de atenção e hiperatividade

TECAN – leitor de microplacas

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa

VMAT - transportador vesicular de monoaminas

SUMÁRIO

CAPÍTULO I Avaliação do efeito neuroprotetor da cafeína em fatias de estriado expostas à 6-OHDA

1	INTRODUÇÃO.....	15
1.1	DOENÇA DE PARKINSON.....	15
1.2	A CAFEÍNA COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA NA DOENÇA DE PARKINSON.....	17
1.3	SUMOILAÇÃO.....	20
1.4	USO DA 6-OHDA COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA DP.....	22
1.5	ESTRIADO COMO ESTRUTURA ALVO NA DP.....	24
2	JUSTIFICATIVA.....	25
3	HIPÓTESE.....	26
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	OBJETIVO GERAL.....	26
4.2	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	26
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	26
5.1	ANIMAIS.....	26
5.2	PREPARAÇÃO DAS FATIAS.....	27
5.3	TRATAMENTOS.....	27
5.3.1	CAFEÍNA.....	27
5.3.2	6-HIDROXIDOPAMINA.....	27
5.3.3	TRATAMENTO DAS FATIAS.....	27
5.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT.....	28
5.5	ANÁLISE ESTÁTISTICA.....	29
6	RESULTADOS.....	29
7	DISCUSSÃO.....	30
8	CONCLUSÃO.....	33

CAPÍTULO II | "Investigação do envolvimento da SUMOilação no efeito neuroprotetor da cafeína"

8.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
8.2	GPS-SUMO – ANÁLISE INTERAÇÃO SUMO X A2AR	35
9	RESULTADOS	35
9.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	35
9.2	MECANISMOS NEUROPROTERES CLÁSSICOS DA CAFEÍNA	35
9.3	SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS COMO POTENCIAL MECANISMO NEURPROTETOR DA CAFEÍNA NA DP	39
10	CONCLUSÃO	45
11	REFERÊNCIAS	46

Esta dissertação foi dividida em dois capítulos.

O capítulo I discorre sobre a avaliação *ex vivo* do efeito neuroprotetor da cafeína em fatias de estriado expostas à 6-OHDA.

O capítulo II discorre sobre a investigação do envolvimento da SUMOilação no efeito neuroprotetor da cafeína por meio de resultados *in silico* e uma revisão da literatura.

CAPÍTULO I

Avaliação do efeito neuroprotetor da cafeína em fatias de estriado expostas à 6-OHDA

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE PARKINSON

Em virtude do envelhecimento populacional, existe atualmente um aumento na incidência e relevância das doenças neurodegenerativas. Dentre estas “doenças da idade” destaca-se a doença de Parkinson (DP), que de acordo com o estudo *Global Burden of Disease*, é o distúrbio neurológico que mais cresce (em taxas padronizadas de prevalência, deficiência e mortes por idade) (FEIGIN et al., 2017). Embora desde as primeiras observações clínicas, realizadas por James Parkinson em 1817, a DP ter sido caracterizada como um “distúrbio do movimento” e os sintomas motores ainda serem utilizados no diagnóstico clínico da DP, atualmente existe um interesse crescente pelos sintomas não motores (POEWE, 2017). O avanço do conhecimento acerca das manifestações clínicas caminha junto com o progresso da caracterização das alterações neuropatológicas envolvidas na DP.

A degeneração de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc), sugerida por Édouard Brissaud em 1895 e depois confirmada por Konstatin Tretiakoff em 1919, representa até hoje a principal alteração neuropatológica desta doença, além da formação das inclusões citoplasmáticas conhecidas por corpos de Lewy, descritas em 1912 por Friederich Heinrich Lewy (HOLDORFF, 2019). A relação entre a redução nos níveis de dopamina e a DP foi sugerida a partir do trabalho pioneiro de Arvid Carlsson e Oleh Hornykiewicz em 1957. Os autores demonstraram que o uso da L-DOPA (precursor de catecolaminas) reverteu os déficits motores em coelhos induzidos pela reserpina, um inibidor do transportador vesicular de monoaminas (VMAT), enquanto o precursor de serotonina (L-5-hidroxitriptofano) não reverteu este quadro parkinsoniano (LEES et al., 2015). Até então, não se creditava a dopamina uma ação como neurotransmissor, sendo considerada um mero precursor da síntese de noradrenalina. A identificação do papel da dopamina surgiu como grande descoberta neuroquímica, o que possibilitou o desenvolvimento dos primeiros modelos experimentais da DP (CARLSSON et al., 1957). Em 1958, Carlsson e colaboradores demonstraram que a dopamina estava presente no cérebro e sugeriram a relação da DP com a deficiência de dopamina cerebral (CARLSSON et al., 1958). Corroborando com os achados de Carlsson, Hornykiewicz em 1960 quantificou a dopamina e a noradrenalina em encéfalos humanos post-mortem e observou a deficiência de dopamina na via nigroestriatal em indivíduos com a DP (EHRINGER; HORNYKIEWICZ, 1960). Essas evidências foram de suma importância para

elucidar o papel da dopamina na sinalização dos núcleos da base e o controle motor. Em seguida, a L-DOPA foi testada em pacientes com a DP, sendo aprovada pela U.S. Food and Drug Administration (FDA) para uso clínico em 1970, permanecendo até os dias atuais como o principal tratamento farmacológico para a DP (FAHN, 2014).

Dentre as principais alterações bioquímicas e moleculares que ocorrem na DP, pode-se destacar o acúmulo da proteína alfa-sinucleína, responsável pela formação dos corpos de Lewy, tendo papel central na patogênese na DP (SPILLANTINI et al., 1997). Os corpos de Lewy, formados principalmente pelo acúmulo da proteína alfa-sinucleína, são encontrados tanto nos casos idiopáticos quanto genéticos da DP, e um marco crucial acerca da relevância destas inclusões citoplasmáticas foi o estudo de Braak e colaboradores (2003). Braak e colaboradores demonstraram que a progressão da distribuição dos corpos de Lewy no sistema nervoso central (SNC) na DP ocorre em 6 estágios. O seu acúmulo iniciaria em áreas olfatórias e tronco cerebral, sendo que somente nos estágios 3 e 4 atingiria a SNpc, quando os primeiros sintomas motores da DP se manifestam (BRAAK et al., 2002). A hipótese de Braak corrobora com os sintomas pré-clínicos observados na DP, como constipação, distúrbio do sono REM (do inglês, *rapid eye movement*), disfunção olfatória e autonômica, depressão, que ocorrem na fase prodromica desta doença (cerca de 15-20 anos antes do aparecimento dos sintomas motores), período marcado pelo início e progressão da neurodegeneração (MANTRI et al., 2019).

A consolidação da importância da alfa-sinucleína na DP ocorreu com a descrição de que o excesso da produção da proteína alfa-sinucleína de tipo selvagem também está associado ao aumento no risco do desenvolvimento da DP (SINGLETON et al., 2003). Atualmente, alguns outros genes mutados estão relacionados com a etiologia da DP, como: SNCA, LRRK2, VPS35, PRKN, PINK1, GBA e DJ-1. Dentre estes, LRRK2, PINK1 E DJ-1 são proteínas responsáveis pela regulação da fissão e fusão mitocondrial, o que sugere que alterações na dinâmica mitocondrial contribuem para o processo neurodegenerativo observado na DP (WANG, 2012). Ainda que as formas familiares da DP representem apenas 5-10% de todos os casos, os estudos genéticos têm permitido esclarecer vários mecanismos envolvidos na fisiopatologia da doença, já que muitos dos genes associados com a DP são responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas em vias moleculares alteradas nas formas esporádicas da DP (POWE et al., 2017).

Dentre os tratamentos farmacológicos da DP, a reposição dopaminérgica permanece até os dias atuais como o tratamento padrão ouro. Entretanto, uma grande limitação é que após o

tratamento crônico com a L-DOPA (mais comum após 5 anos de tratamento) ocorrem efeitos indesejados numa parcela significativa dos pacientes, como as discinesias (movimentos involuntários) e flutuações motoras do tipo *on-off* (CONNOLLY & LANG., 2014). Além da L-DOPA, o tratamento da DP envolve o uso de fármacos com diferentes mecanismos de ação, como os agonistas de receptores dopaminérgicos (pramipexol), inibidores das enzimas de degradação de monoaminas (monoamina oxidase-B (iMAO-B) selegilina e rasagilina; iCOMT: entacapona), antiglutamatérgicos (amantadina), o recentemente aprovado antagonista de receptores A2A (A2AR) para adenosina (istradefilina), e anticolinérgicos (triexifenidil e biperideno) que exercem ação indireta sobre o sistema dopaminérgico (CHEN & CUNHA, 2020). Todos estes fármacos disponíveis para o tratamento da DP estão focados no alívio dos sintomas motores, e a L-DOPA é normalmente utilizada em associação com os inibidores da DOPA descarboxilase, para reduzir os efeitos periféricos relacionados ao aumento da transmissão dopaminérgica (CONNOLLY; LANG, 2014).

A introdução de medidas de qualidade de vida nos estudos clínicos com pacientes parkinsonianos levou ao reconhecimento de que a multiplicidade dos sintomas possui um impacto mais amplo sobre os pacientes do que apenas a deficiência motora (CHAUDHURI, 2009). Entretanto, atualmente as intervenções farmacológicas disponíveis para a DP ainda são meramente paliativas, principalmente direcionadas para o tratamento dos sintomas motores e para amenizar os efeitos indesejados da L-DOPA, e nenhuma atua sobre o processo neurodegenerativo, que continua a progredir (JANKOVIC; TAN, 2020).

1.2 A CAFEÍNA COMO ESTRATÉGIA NEUROPROTETORA NA DOENÇA DE PARKINSON

Considerando a importância da pesquisa sobre novas terapias preventivas e neuroprotetoras na DP, estudos epidemiológicos e experimentais vêm demonstrando o potencial neuroprotetor da cafeína, além dos seus efeitos positivos sobre os sintomas motores e não motores na DP (para revisão ver PREDIGER, 2010; SCHEPICI et al., 2020). A cafeína é a substância psicoativa mais consumida em todo o mundo, encontrada em chás, ervas-mate e no café. O Brasil é o segundo maior consumidor de café a nível mundial, segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Café (ABIC), em 2018 os brasileiros consumiram em média 839 xícaras de café por pessoa por ano.

O estudo do papel neuroprotetor da cafeína teve crescimento exponencial a partir dos anos 2000, quando um estudo epidemiológico publicado por Ross e colaboradores com pacientes (homens com idade entre 45-68 anos) participantes do programa longitudinal prospectivo Honolulu Heart entre 1956 e 1968, demonstrou a associação inversa entre o consumo de cafeína e a incidência da DP (ROSS et al., 2000). Desde então, uma série de outros estudos confirmaram essa associação, correlacionando o consumo moderado de cafeína (400 mg por dia) com a redução do risco do desenvolvimento da DP em ambos os sexos, com a exceção de mulheres que faziam uso de terapia hormonal (ASCHERIO et al 2004; KIM et al. 2017).

Em modelos experimentais da DP já foi demonstrado que a cafeína atenua a morte de neurônios dopaminérgicos no estriado (CHEN et al., 2001), assim como também reverte os prejuízos de memória de reconhecimento social e locomotores (GAVEARD et al., 2001; PREDIGER et al., 2005; AGUIAR et al., 2009). O tratamento com cafeína (1 g/L) em ratos protegeu contra a neurodegeneração dopaminérgica induzida pela administração crônica (14 dias) da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), mesmo quando administrada após o início do processo neurodegenerativo (SONSALLA et al., 2012). Em um outro modelo animal da DP induzido pela injeção intraperitoneal (i.p) de MPTP, a cafeína (10 mg/kg, i.p.) também protegeu contra a neurodegeneração dopaminérgica induzida pela neurotoxina, além de bloquear as reduções das proteínas de junções de oclusões no estriado, indicando um possível efeito da cafeína na estabilização da barreira hematoencefálica (CHEN et al., 2008). Outro estudo conduzido por Yu e colaboradores (2006) utilizando o modelo da injeção intra-estriatal da neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) em camundongos demonstrou que a coadministração diária de cafeína (2, 5 ou 10 mg/kg) e L-DOPA (2 mg/kg) melhorou o comportamento rotacional induzido pela 6-OHDA, em comparação com a cafeína ou a L-DOPA sozinhas, o que sugere que a exposição repetida a cafeína pode alterar as respostas a L-DOPA na DP. A neuroproteção conferida pela cafeína (30 mg/kg) também foi observada em um modelo de DP em ratos induzido pela rotenona, um inibidor da co-enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH), demonstrando os efeitos protetores da cafeína contra danos neuroquímicos, histológicos e comportamentais deste pesticida (KHADRAWY et al., 2017). Além disso, a cafeína também apresentou efeito neuroprotetor em animais que receberam injeção intra-estriatal de fibrilas da alfa-sinucleína A53T mutante, e esse efeito foi associado ao aumento da atividade de autofagia, principalmente pela autofagia mediada por chaperonas (LUAN et al., 2018a).

A cafeína é um antagonista não seletivo dos receptores A_{2A} (A_{2AR}) para adenosina e o bloqueio destes receptores estimula a neurotransmissão dopaminérgica no estriado e em outras regiões do SNC acometidas na DP (PREDIGER, 2010). Estudos recentes sobre interações entre a adenosina e a dopamina no estriado e entre os seus principais alvos, os A_{2AR} e os receptores D₂ para dopamina (D_{2R}) respectivamente, evidenciam a formação de um heterotetrâmero A_{2AR}-D_{2R} pós-sináptico. Este heterotetrâmero forma então um complexo pré-acoplado que também inclui a adenilato ciclase do subtipo 5, e este complexo pode ser uma peça chave para a compreensão molecular dos efeitos psicoestimulantes da cafeína, que continuam pouco esclarecidos (FERRÉ; CIRUELA, 2019). Este mecanismo molecular será abordado com maiores detalhes no Capítulo II desta dissertação.

Devido aos resultados promissores observados em estudos epidemiológicos e em modelos experimentais da DP, Postuma e colaboradores (2012) realizaram o primeiro ensaio clínico randomizado controlado para avaliar os efeitos da cafeína em pacientes com a DP. O estudo foi conduzido por 6 semanas (administração de doses de 100 mg de cafeína duas vezes ao dia durante 3 semanas, seguido por 200 mg de cafeína duas vezes ao dia durante 3 semanas ou placebo) para avaliar os efeitos sobre a sonolência diurna, complicações motoras e outros sintomas não motores da DP. Os resultados revelaram que a cafeína promoveu apenas uma pequena melhora em relação a margem de sonolência diurna excessiva da DP (POSTUMA et al., 2012). A partir deste ensaio, os autores sugeriram que um ensaio de longo prazo seria necessário para validar estes resultados preliminares. Então, em 2017, Postuma e colegas publicaram um ensaio com duração de 6-18 meses, com 60 pacientes recebendo cafeína (cápsulas contendo 200 mg de cafeína duas vezes ao dia, o que corresponde a aproximadamente 3 xícaras de café por dia) e 61 pacientes recebendo placebo. Todos os pacientes apresentavam DP esporádica entre 45–75 anos, no estágio I – III de Hoehn & Yahr e receberam terapia para os sintomas da DP por 6 meses. A escala de Hoehn & Yahr é uma escala de avaliação da incapacidade dos indivíduos com doença de Parkinson que identifica de uma forma rápida e prática o estado geral dos mesmos, os classificados nos estágios de 1 a 3 apresentam incapacidade leve a moderada, enquanto os que estão nos estágios 4 e 5 apresentam incapacidade grave (RODRIGUES et al., 2005). Neste ensaio controlado, a cafeína não apresentou benefício sobre os sintomas motores da DP, além de piorar as pontuações nos testes cognitivos (POSTUMA et al., 2017). Recentemente, um estudo controlado conduzido por Medeiros e colaboradores (2021) avaliou a relação entre a ingestão de chimarrão (infusão de *Ilex paraguariensis*) e o desenvolvimento da DP. O chimarrão é uma bebida consumida no Sul do Brasil e outros países da América Latina e que possui a cafeína como um dos seus constituintes majoritários, e este estudo demonstrou uma associação inversa entre o alto consumo de chimarrão (6 cuias por dia) e o desenvolvimento da DP. O autores sugerem que este efeito

protetor observado pode estar relacionado a cafeína e a outros compostos antioxidantes presentes no chimarrão (MEDEIROS et al., 2021).

Adicionalmente, já foi demonstrado que a cafeína pode exercer efeitos neuroprotetores através da estimulação das defesas antioxidantes, induzindo a síntese de glutathione (GSH) por meio do aumento da captação de cisteína (AYOAMA et al., 2011). Além disso, em modelos experimentais da DP, a cafeína pode inibir a MAO-B que catalisa a oxidação da dopamina e gera H₂O₂, essa produção desregulada de H₂O₂ pode causar uma inibição de dopamina no estriado (BAO et al., 2005). O papel anti-inflamatório da cafeína também já foi observado, pois esta reduz a ativação microglial e a liberação de citocinas e radicais livres, reduzindo a liberação de glutamato, evitando danos adicionais à SNpc e aos neurônios do estriado (MORELLI et al., 2009). Com base nas informações obtidas da literatura, é possível apontar possíveis mecanismos moleculares envolvidos na neuroproteção da cafeína, que ainda não estão claramente evidenciados, e a busca por esses mecanismos pode apontar para novos alvos farmacológicos e alterações moleculares ainda desconhecidas na DP.

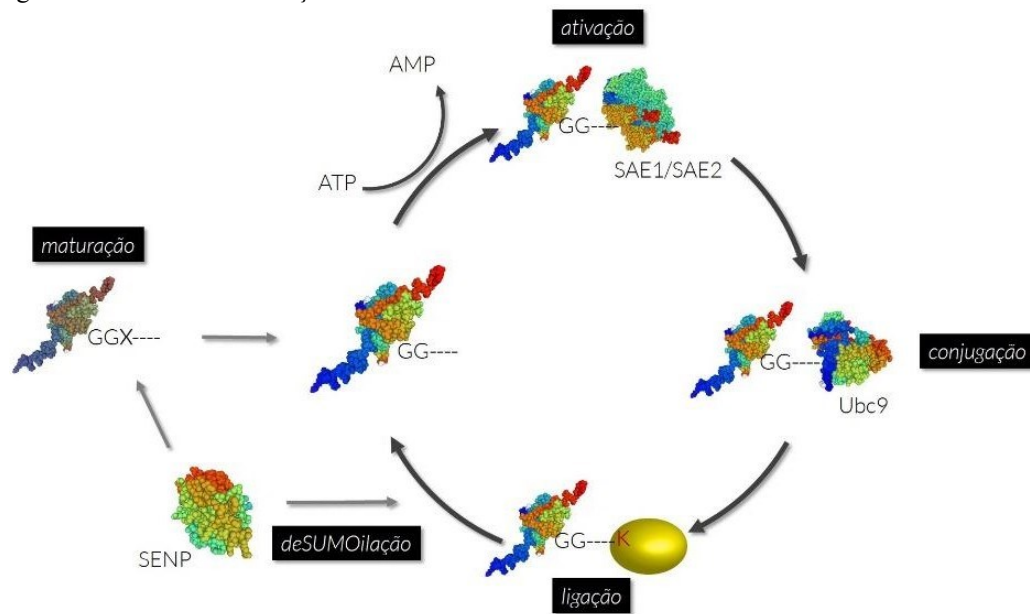
1.3 SUMOILAÇÃO

Na busca pela compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na neuroproteção exercida pela cafeína, evidencia-se uma possível participação da SUMOilação. Esta é uma modificação pós-traducional (MPT) em que ocorre a ligação covalente de uma proteína de 101 aminoácidos chamada SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) em proteínas pré-existentes na célula. Muitas proteínas, após serem traduzidas pelos ribossomos, passam por MPTs que influenciam a sua função biológica por meio da alteração da sua localização subcelular, da sua interação com ligantes ou outras proteínas e seu estado funcional (GUO et al., 2013; LEE et al., 2017). Atualmente, as principais MPTs descritas na literatura são a fosforilação, a ubiquitinação e a SUMOilação. O processo de fosforilação e desfosforilação é responsável pela regulação de diversos processos celulares, regulando as funções das proteínas em resposta a estímulos e permitindo que as células detectem e respondam ativamente às mudanças em seu ambiente. A ubiquitinação é também um processo chave para a sobrevivência e manutenção celular, uma vez que uma das principais funções da proteína ubiquitina (Ub) é marcar proteínas para degradação proteossômica (para revisão ver Junqueira et al., 2018).

Na SUMOilação, a ligação covalente da SUMO dá-se nas regiões consenso que contém o aminoácido lisina, modulando a atividade, estabilidade e localização subcelular da proteína pré-

existente (HENLEY et al., 2014). Uma outra forma de interação com as moléculas de SUMO são interações não covalentes com proteínas contendo uma região de aminoácidos cercada por resíduos hidrofóbicos chamados motivos de interação SUMO (SIMs) (SONG et al., 2004; LANG et al., 2016). A SUMOilação é um processo fisiológico e reversível, pois as proteínas alvo são constantemente SUMOiladas e deSUMOiladas devido a ação, principalmente, das SUMO proteases (SENPs), como pode-se observar no ciclo da SUMOilação (Figura 1).

Figura 1: Ciclo de SUMOilação



Legenda: Para iniciar um ciclo de SUMOilação uma SUMO deve ser proteoliticamente clivada para expor a região glicina-glicina (GG) no seu terminal carboxila. Isto é realizado pelas proteases específicas da SUMO da família SENP. A SUMO madura é ativada pelo heterodímero E1 SAE1 / SAE2 em uma etapa que consome ATP, resultando na formação de uma ligação tioéster entre a glicina C-terminal de SUMO e a cisteína catalítica (C) de SAE2. A SUMO é então transferida para a cisteína catalítica da enzima E2, Ubc9, formando novamente uma ligação tioéster. A Ubc9 catalisa a formação de uma ligação isopeptídica entre a glicina e o terminal carboxila de SUMO e um resíduo de lisina (K) no substrato, geralmente junto com uma ligase específica de SUMO E3. A SUMOilação é reversível devido às proteases específicas de SUMO, como por exemplo as SENPs, que clivam a ligação isopeptídica e libertam a SUMO para outros ciclos. Abreviação: X, aminoácidos do terminal carboxila da região GG em SUMO imatura. Adaptado de Flotho e Melchior (2013).

Atualmente são descritas 5 isoformas da proteína SUMO em mamíferos, denominadas SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4 e SUMO5. Compartilhando 50% de homologia com a isoforma SUMO1, existem as isoformas SUMO2 e SUMO3 (diferem apenas 3 resíduos entre si) sendo

assim denominadas SUMO2/3 (HENLEY et al., 2014). Descrita há 20 anos, já foi demonstrado que a SUMOilação tem um papel importante na regulação de proteínas envolvidas no envelhecimento celular, na DP e em inúmeras outras doenças do SNC, como isquemia, doença de Alzheimer, doença de Huntington, entre outras (para revisão ver SILVEIRINHA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2013; ANDERSON et al., 2017).

A relação entre a SUMO e a DP foi descrita a partir da identificação de que proteínas como a α -sinucleína, Drp1, PINK1, Parkin, LRRK2, DJ1 e outras proteínas relacionadas com a patogênese da DP são alvos de SUMOilação (JUNQUEIRA et al., 2018). Um estudo pioneiro com amostras de sangue de pacientes com a DP avaliou os níveis de diferentes MPTs da proteína α -sinucleína (VICENTE MIRANDA et al., 2017). Dentre elas, identificou-se um nível reduzido da SUMOilação da alfa-sinucleína por SUMO-1 nos eritrócitos de pacientes com a DP comparado aos eritrócitos de indivíduos saudáveis. Por meio de uma análise combinatória das alterações encontradas nas MPTs e a progressão da DP, a SUMOilação foi apontada como um potencial marcador biológico da progressão da DP. Segundo evidências da literatura, a modificação em uma mesma proteína alvo no SNC difere de acordo com a isoforma da SUMO com a qual está ligada (HENLEY et al., 2014; HENLEY et al., 2018).

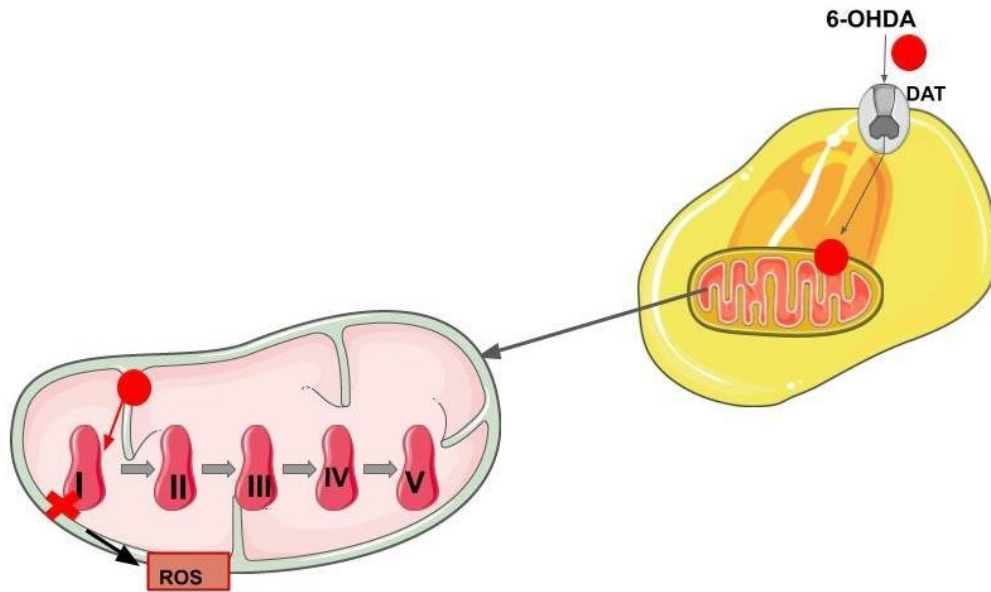
Em modelos de hibernação foi descrito um aumento dos níveis e o acúmulo de proteínas nucleares conjugadas a SUMO 2/3 em animais submetidos a condições hipotérmicas, esse aumento de SUMOilação também exerceria função neuroprotetora nesse processo fisiológico (para revisão ver: BERNSTOCK et al., 2017). Na hibernação, os animais ficam sob condições de baixa oxigenação e aporte de nutrientes ao cérebro, o que mimetiza uma isquemia. Em suma, baseado nos dados obtidos na literatura, a modulação da SUMOilação pode representar um mecanismo importante para o controle do processo neurodegenerativo e neuroproteção, o que sugere a sua relevância potencial na DP.

1.4 USO DA 6-OHDA COMO FERRAMENTA PARA O ESTUDO DA DP

A 6-OHDA vem sendo utilizada desde a década de 1960 como um modelo experimental para o estudo dos mecanismos de neurodegeneração (PORTER TOTARO & STONE, 1963; URETSKY & IVERSEN, 1969) e alterações motoras (BURKAD, JALFRE & BLUM, 1969) observadas na DP. Esta neurotoxina é um análogo hidroxilado da dopamina natural (BLUM et al., 2001), sendo captada pelos transportadores de dopamina e noradrenalina nos terminais

neuronal. A 6-OHDA pode se auto-oxidar e gerar espécies reativas ao oxigênio (EROs) que causam danos intracelulares, além de inibir a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial induzindo mecanismos que levam a morte neuronal, como demonstrado na Figura 2 (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008; KUPSCH ET al., 2014).

Figura 2: Mecanismo de ação da 6-OHDA.



10

Legenda: A 6-OHDA entra nos neurônios dopaminérgicos através do transportador de dopamina (DAT), em seguida em consecutivas reações é oxidada, gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O aumento do estresse oxidativo e o dano à função mitocondrial (inibição do complexo I) levam a ativação de vias de morte celular. Adaptado de Bover e Perier (2012).

Este modelo tem como uma de suas principais características a versatilidade, a partir do uso *in vivo* de diferentes doses e locais de administração da 6-OHDA é possível a obtenção de lesões totais ou parciais da via nigroestriatal, permitindo o estudo de diferentes estágios da DP (HEUER et al., 2012). Ademais, a neurodegeneração dopaminérgica induzida por este modelo é mais reprodutível, uma vez que em outros modelos são observadas maiores variabilidades individuais (BLANDINI, ARMENTERO & MARTIGNONI, 2008). A principal limitação é que esta toxina não atravessa a barreira hematoencefálica em condições fisiológicas normais (BLUM et al., 2001). Sendo assim, é necessário que seja realizada uma cirurgia estereotáxica para a sua administração no SNC, podendo ser injetada em diferentes regiões encefálicas, como a SNpc, o estriado e o feixe prosencefálico medial (HEUER et al., 2012).

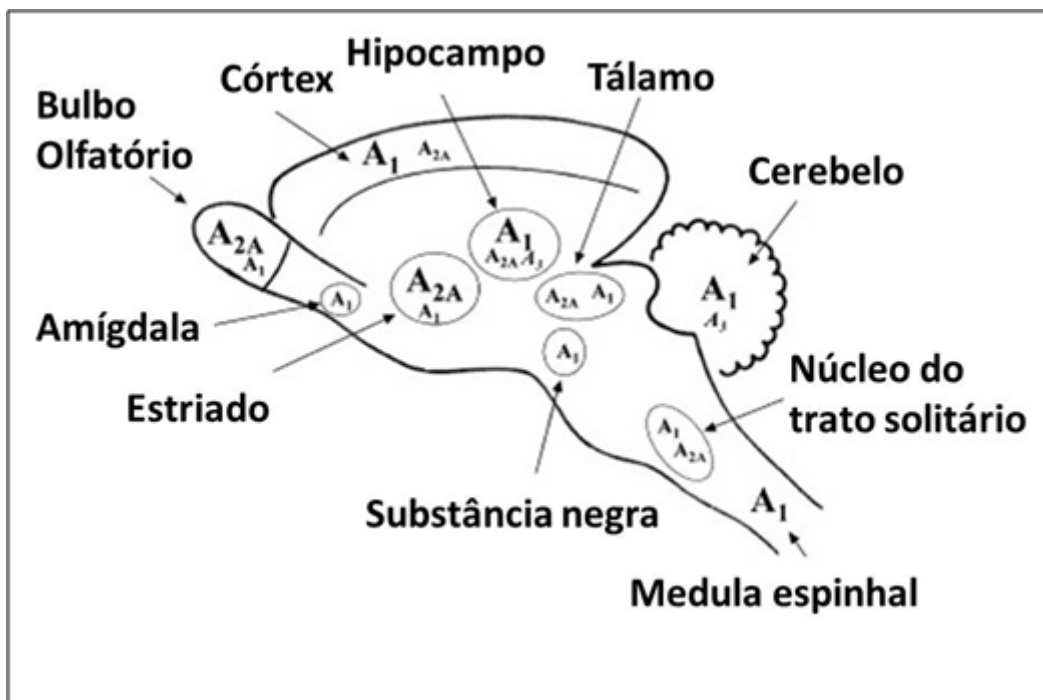
A partir da relevância deste modelo e a importância de modelos *in vitro* que também reproduzam danos característicos da DP, recentemente foi validado o protocolo de 6-OHDA *in vitro* demonstrando a toxicidade desta substância em fatias de estriado, hipocampo e córtex cerebral de ratos (MASSARI et al., 2016). Neste estudo, constatou-se, a partir da realização de curvas concentração-resposta e tempo-resposta, que a incubação das fatias com 6-OHDA (100 μ M) por 1 h, seguida de 3 h em meio celular nutritivo (DMEM), reduz a viabilidade celular em cerca de 50-60% em todas as áreas cerebrais analisadas. Este modelo também induz disfunção mitocondrial, com consequente geração de EROs, alterações comumente encontradas na DP (BEAL., 2005; LIN E BEAL, 2006; MARQUES et al., 2019). Ademais, trabalhos anteriores demonstraram o efeito neuroprotetor da cafeína no modelo da 6-OHDA, como na pesquisa com a injeção unilateral de 6-OHDA (8 μ g) na SNpc de ratos, que induziu bradicinesia e distúrbios motores nos animais, sendo estas alterações atenuadas pela injeção intraperitoneal aguda de cafeína (30 mg/kg) (REYHANI-RAD & MAHMOUNDI., 2016). Neste mesmo modelo de injeção unilateral de 6-OHDA foi observado um aumento na imunorreatividade de marcadores inflamatórios (TNF-alfa e IL-1) no estriado e na substância negra de ratos, indicando a existência da neuroinflamação, que está envolvida com o progresso neurodegenerativo observado na DP (PRZEDBORSKI, 2010). O tratamento diário com cafeína (20 mg/kg) reduziu a imunorreatividade em ambas as áreas afetadas neste modelo (MACHADO-FILHO et al., 2014).

1.5 ESTRIADO COMO ESTRUTURA ALVO NA DP

Conforme mencionado na sessão 1.1, a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc é a principal alteração neuropatológica da DP (POEWE et al., 2017). Esta perda neuronal na SNpc resulta em deficiência de dopamina na região do estriado (via dopaminérgica nigroestriatal), principal alteração relacionada ao desenvolvimento dos sintomas motores clássicos da DP (DEXTER E JENNER, 2013). A região do estriado é considerada uma região com diversas funções, pois recebe projeções dos núcleos basais, e de várias outras áreas encefálicas envolvidas com funções motoras e não motoras, como o córtex motor, o córtex pré-frontal, o hipocampo e o *núcleo accumbens* (DEVAN, HONG & MCDONALD, 2011; GUTHRIE et al., 2013).

Nos seres humanos, o estriado é formado pelos núcleos caudado e putâmen, sendo esta a estrutura com maior degeneração na DP (OBESO et al., 2008). Em roedores, o estriado pode ser subdividido em estriado ventral (*núcleo accumbens* e tubérculo olfatório) e estriado dorsal (complexo caudado-putâmen) (DEVAN, HONG & MCDONALD, 2011). Recentemente, demonstrou-se que após 7 dias a indução de uma lesão parcial (aproximadamente 50%) com 6-OHDA (10 µg por estriado) no estriado dorsal de ratos, estes apresentam comportamentos do tipo-anedônico. Adicionalmente, 21 dias após a injeção intra-estriatal de 6-OHDA observou-se comportamentos do tipo-depressivo nestes mesmos animais (MATHEUS et al, 2016). Contudo, além do envolvimento do dano à essa região estar associado com sintomas motores e não motores da DP, é também nos neurônios localizados no estriado que observar-se a maior densidade de receptores A2A no SNC (GERFEN, 2011) conforme ilustrado na figura abaixo, o principal alvo da cafeína descrito na literatura até o momento.

Figura 3: Densidade dos receptores para adenosina nos neurônios.



Legenda: Densidade dos receptores para adenosina nas regiões cerebrais (Medula espinhal, Substância negra, Cerebelo, Tálamo, Estriado, Hipocampo, Córtex, Bulbo Olfatório e Amígdala). Adaptado de Ribeiro et. al, Progress in Neurobiology 68 (2003).

2 JUSTIFICATIVA

A DP é a principal doença que afeta o controle motor e a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no mundo, e em virtude do envelhecimento populacional é esperado um grande aumento da incidência da DP nas próximas décadas. Atualmente, os tratamentos disponíveis para a DP são meramente paliativos e não impedem a progressão da

doença, o que evidencia a importância da busca por novas intervenções farmacológicas, incluindo substâncias com ação neuroprotetora. Neste sentido, existem diversos estudos epidemiológicos e em modelos animais indicando o potencial efeito neuroprotetor da cafeína na DP. A elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos neuroprotetores da cafeína poderão auxiliar a vislumbrar novos alvos farmacológicos e alterações moleculares ainda desconhecidas na DP.

Diante deste cenário e considerando o crescimento de pesquisas evidenciando o envolvimento da SUMOilação em doenças neurodegenerativas como a DP, seu possível papel neuroprotetor em diversas condições patológicas do SNC, e seu envolvimento em vias antioxidantes, é possível que este processo fisiológico seja a chave para a compreensão dos mecanismos ainda não esclarecidos da neuroproteção exercida pela cafeína.

3 HIPÓTESE

Diante do exposto acima, a hipótese do presente estudo é de que a cafeína exerça efeitos neuroprotetores em fatias de estriado expostas a 6-OHDA e que o processo de SUMOilação representa um mecanismo importante neste efeito neuroprotetor da cafeína.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o envolvimento da SUMOilação nos efeitos neuroprotetores exercidos pela cafeína em fatias de estriado de ratos expostas à 6-OHDA.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Avaliar a toxicidade da 6-OHDA em fatias de estriado;

Avaliar o efeito das diferentes concentrações de cafeína nas fatias de estriado;

Avaliar o efeito neuroprotetor da cafeína em fatias de estriado expostas à 6-OHDA;

Investigar o envolvimento da SUMOilação no efeito neuroprotetor da cafeína através de uma revisão da literatura e de resultados prévios obtidos pelo software GPS-SUMO.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 6 animais machos da espécie *Rattus Norvegicus* da linhagem Wistar com cerca de 90 dias de idade (350-400 g), fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) segundo protocolo de número 3528250619. O uso desta espécie e linhagem foi

baseado em estudos prévios presentes na literatura que padronizaram o modelo *in vitro* de fatias de estriado de ratos Wistar submetidas à 6-OHDA (MASSARI et al., 2016; MARQUES et al., 2019).

5.2 PREPARAÇÃO DAS FATIAS

Para a obtenção das fatias de estriado, todos os animais foram anestesiados por via inalatória com isoflurano (1 mL/g) e então foram eutanasiados por decapitação em guilhotina. Em seguida, ocorreu a rápida dissecação do encéfalo sobre gelo para a retirada dos estriados, que foram imediatamente fatiados (400 μm) em um fatiador de tecidos (McIlwain). Na sequência, foi realizado o processo de recuperação destas fatias de estriado, incubando-as por 30 minutos a 37°C em 1 mL de solução de KREBS (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,3 mM CaCl₂, 0,4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ e 10 mM D-glucose, gaseificada com 95% CO₂/ 5% O₂ em pH 7,4) por poço contendo 3 fatias de cada grupo (poço).

5.3 TRATAMENTOS

5.3.1 CAFEÍNA

Foram utilizadas as concentrações de 30, 60 e 100 μM de cafeína (diluídas em KREBS). As concentrações de cafeína foram selecionadas com base em estudos *in vitro* prévios descritos na literatura a fim de aproximar-se da concentração (20-70 μM) encontrada no cérebro de humanos que consomem cafeína moderadamente (THITHAPANDHA et al., 1972; KAPLAN et al., 1990; COSTENLA et al., 2010).

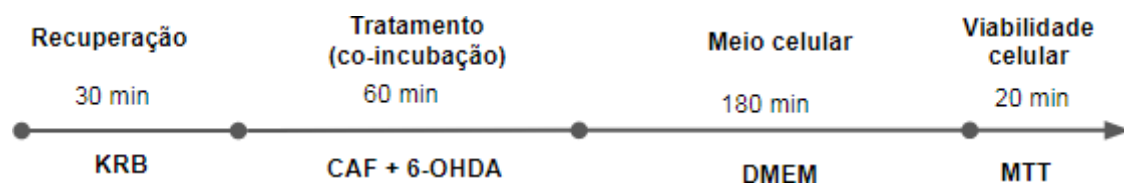
5.3.2 6-HIDROXIDOPAMINA

A 6-OHDA (100 μM) foi diluída em água ultrapura com a adição de metabissulfito de sódio na concentração de 0,1% para evitar processos de auto-oxidação, e então armazenada a -20 °C.

5.3.3 TRATAMENTO DAS FATIAS

As fatias foram divididas em 8 grupos experimentais: Controle (KREBS); Cafeína 30 μM ; Cafeína 60 μM ; Cafeína 100 μM ; 6-OHDA; 6-OHDA + Cafeína 30 μM , 6-OHDA + Cafeína 60 μM ; 6-OHDA + Cafeína 100 μM . As fatias foram tratadas com 6-OHDA (100 μM) ou tampão KREBS (controles) e todos os experimentos foram realizados em triplicatas. O modelo utilizando fatias foi realizado com a co-incubação de cafeína + 6-OHDA por 1 hora nos poços com a solução de KREBS. Após esse período, para avaliação da viabilidade celular, as fatias foram mantidas em uma incubação adicional em meio celular nutritivo (DMEM), composto por 50% de KREBS, 50% DMEM e 20 mM de HEPES durante 3 horas na estufa 95% CO_2 / 5% O_2 a 37°C. Abaixo, a Figura 3 representa o desenho experimental.

Figura 3: Desenho experimental



Legenda: A figura acima representa o desenho experimental utilizado para o tratamento e para medir a viabilidade celular das fatias pós tratamento. As fatias foram inicialmente incubadas com a solução de KREBS na placa para cultivo celular de 24 poços na etapa de recuperação, que durou 30 minutos. Após, o tratamento foi realizado com a co-incubação da cafeína e da 6-OHDA por 60 minutos. Ao final dos 60 minutos, retirou-se a solução de Krebs com o tratamento, e as fatias foram mantidas por 180 minutos na solução composta por 50% de KREBS, 50% DMEM e 20 mM de HEPES na estufa 95% CO_2 / 5% O_2 a 37°C. No final dos 180 minutos, o teste de viabilidade celular MTT foi realizado.

5.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO MÉTODO DE MTT

Todos os grupos foram submetidos ao método colorimétrico que mede a viabilidade celular através da redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium). Desidrogenases mitocondriais (especialmente a enzima mitocondrial succinato desidrogenase) presentes apenas em células metabolicamente viáveis clivam o anel de tetrazólio transformando-o de um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul

escuro, chamado de formazan {E,Z- 1-(4,5-dimetilazol-2-yl)-1,3-difenilformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória.

O MTT foi diluído em KREBS, adicionado às fatias estriatais após o período de incubação de 3 horas no DMEM. Foram incubados 500 μ L de MTT (0,5 mg/mL) diluídos em KREBS para cada fatia por 20 minutos no escuro. O formazan formado foi então solubilizado em dimetil sulfoxido (DMSO), formando um composto colorido cuja densidade óptica (DO) foi medida em um leitor de microplacas (TECAN) a 540 nm. A quantificação da coloração obtida é proporcional à viabilidade celular (MOSSMAN., 1983; LIU et al., 1997).

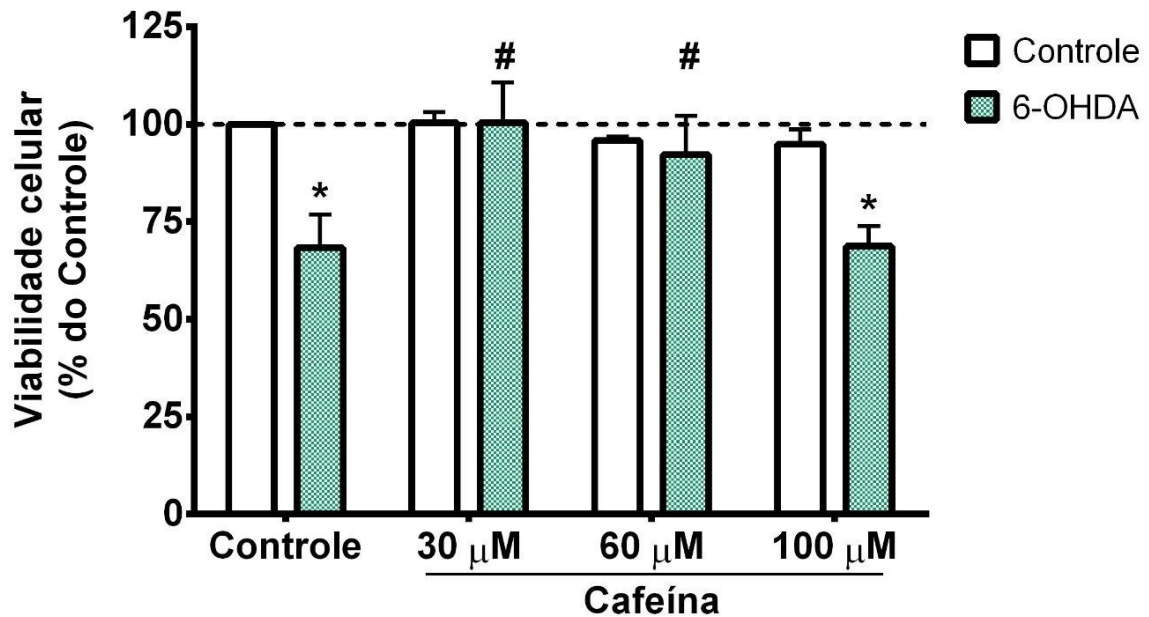
5.5 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os resultados passaram pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido por teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados foram normalizados entre os experimentos e representados como médias + EPM da porcentagem dos controles. A diferença estatística aceita foi de $p < 0,05$. O pacote estatístico utilizado foi o Prisma 7.

6 RESULTADOS

A ANOVA de duas vias indicou uma diferença significativa entre controle e 6-OHDA [$F(3,16)=11,32$; $p < 0,05$], como demonstrado na Figura 4. Observou-se que a toxicidade induzida pela 6-OHDA reduziu a viabilidade celular nas fatias de estriado, quando comparadas com o grupo controle (KREBS). Ainda, o teste de múltiplas comparações de Newman-Keuls revelou uma diferença significativa entre o grupo 6-OHDA e os grupos co-incubados com cafeína 30 e 60 μ M e 6-OHDA (100 μ M). A viabilidade celular das fatias se manteve igual ao controle (KREBS) quando incubadas com cafeína 30 e 60 μ M independente da incubação com 6-OHDA. Já quando co-incubamos 6-OHDA (100 μ M) e cafeína (100 μ M) constatamos a redução da viabilidade celular quando comparada ao controle (KREBS), e viabilidade celular similar ao grupo 6-OHDA.

Figura 4: Efeito da cafeína sobre a viabilidade celular de fatias de estriado avaliada através da técnica de MTT.



Legenda: A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de redução do MTT conforme mencionado no material e métodos. Os dados foram expressos como porcentagem de controles normalizados entre experimentos individuais e estão representados pela média SEM (n=3). $p < 0,05$ vs Controle (*); $p < 0,05$ vs 6-OHDA (#), segundo ANOVA de duas vias seguido por teste *post hoc* de Newman-Keuls.

7 DISCUSSÃO

A importância de modelos *in vitro* têm sido amplamente enfatizadas no meio científico, principalmente na busca por agentes neuroprotetores para doenças neurodegenerativas, como a DP. As preparações *ex vivo*, como as fatias de estruturas cerebrais, fornecem menor complexidade e maior acessibilidade para a dissecação de mecanismos, sendo assim uma ferramenta importante para o *screening* de novos alvos farmacológicos, reduzindo o uso de animais e de recursos financeiros (LE FEBER, 2019).

O resultado obtido neste trabalho quanto a toxicidade da 6-OHDA nas fatias de estriado corrobora com o observado em estudos anteriores quanto a porcentagem de redução da viabilidade celular nestas fatias (aproximadamente 60-70% em relação ao grupo controle) (MASSARI et al., 2016; MARQUES et al., 2019). No estriado, a 6-OHDA induz um dano

imediatamente nos terminais dopaminérgicos estriatais, seguido por uma morte progressiva e lenta celular nos neurônios da SNpc. O dano é cerca de 50-70% de morte celular na SNpc (DEUMENS, 2002; BLANDINI ET AL., 2007). Dessa forma, a neurodegeneração observada no modelo *in vitro* da 6-OHDA em fatias estriatais é similar àquela observada nos estágios iniciais da DP (FEARNLEY, 1991). A reprodução deste modelo rápido e simples surge como uma excelente opção para avaliação de agentes neuroprotetores na DP.

O estresse oxidativo, como uma causa/consequência do dano mitocondrial, está descrito como um dos mecanismos celulares da DP, porém ainda não está definido em que momento (fase inicial ou tardia) o aumento das espécies reativas torna-se evidente (SUBRAMANIAM, 2013). O mecanismo de ação neurotóxico da 6-OHDA está intimamente associado ao estresse oxidativo, por ser análoga a dopamina, a 6-OHDA, uma vez dentro da célula, gera espécies reativas por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (SIMOLA et al., 2007). Além da redução da viabilidade celular, já foi descrito na literatura que a 6-OHDA *in vitro* altera níveis de lactato desidrogenase (LDH), EROs, além de causar permeabilização de membrana celular e uma diminuição do consumo de oxigênio pela mitocôndria no estriado (GIULIANI et al., 2015; GONÇALVES et al., 2019; GONZÁLEZ et al., 2019).

Diversos estudos longitudinais avaliaram fatores ambientais ou comportamentais envolvidos com o risco para o desenvolvimento da DP (ASCHERIO & SCHWARZCHILD., 2016). Como exemplo, podem ser citados: à exposição à pesticidas, o consumo de produtos derivados do leite, histórico de melanoma e acidentes vasculares cerebrais. Por outro lado, um risco reduzido foi associado ao consumo de cafeína, ao tabagismo e ao aumento das concentrações de urato sérico, assim como a prática regular de atividade física (BELVISI et al., 2020). Estudos clínicos randomizados indicam que alguns destes fatores, como o consumo de cafeína, podem ser neuroprotetores e, portanto, benéficos em indivíduos na fase inicial da DP (PALACIOS et al., 2012). O consumo moderado de cafeína (3-5 xícaras de café por dia) está associado com a redução da fadiga, menor declínio cognitivo, e por boa resposta aos testes motores, o que não é observado quando o consumo de cafeína é superior a 5 xícaras diárias (NIEBER, 2017; VAN GELDER et al, 2007).

No presente trabalho, as concentrações de 30 μM e 60 μM de cafeína preveniram a neurotoxicidade da 6-OHDA nas fatias estriatais, e nenhuma das três concentrações (30 μM , 60 μM e 100 μM) alterou a viabilidade celular quando incubadas sozinhas. De forma similar, observou-se que em células mesencefálicas de ratos expostas à 6-OHDA houve uma redução do número de células viáveis, enquanto todas as concentrações de cafeína testadas (0,1, 1 e 5

mg/mL) foram capazes de proteger as células da toxicidade da 6-OHDA (NOBRE et al., 2010). A cafeína (25 mg/kg) atenuou a perda de neurônios dopaminérgicos em um modelo da DP induzido pela administração de MPTP, e a neuroproteção exercida foi atribuída ao antagonismo dos A2AR, uma vez que em animais nocautes para este receptor, a cafeína não exerceu sua proteção frente aos danos induzidos pelo MPTP (XU et al., 2016). O efeito protetor da cafeína frente aos danos no estriado já foi descrito em alguns modelos animais, como em um modelo da DP utilizando injeção intracerebral de fibrilas de alfa-sinucleína A53T no estriado de ratos, em conjunto com o tratamento crônico com cafeína, que evidenciou que a cafeína preveniu as alterações patológicas induzidas pela alfa-sinucleína, incluindo os agregados formados pelo acúmulo dessa proteína, a neuroinflamação e a apoptose celular no estriado (LUAN et al., 2018b). Ademais, é possível que o potencial antioxidante da cafeína (SHI et al., 1991) atue prevenindo a produção de EROS induzida pela 6-OHDA no presente modelo reproduzido neste trabalho, demonstrando a proteção da cafeína aos danos encontrados em uma região conhecida por demonstrar alterações moleculares na fase inicial na DP.

Curiosamente, a maior concentração de cafeína (100 μ M) testada no presente estudo não exerceu efeitos neuroprotetores, apesar desta mesma concentração não apresentar toxicidade quando incubada *per se* com as fatias de estriado. Sabe-se que em concentrações menores a cafeína age como antagonista competitivo não seletivo dos receptores adenosinérgicos. O sistema adenosinérgico promove regulação homeostática em todos os tipos de células e modulação sináptica no SNC, através da modulação da liberação dos neurotransmissores e de sua ação pós-sináptica (CUNHA, 2001), sendo os principais receptores: o receptor A1, amplamente distribuído pelo cérebro e de ação inibitória, e o A2AR, localizado em altas quantidades em poucas regiões, como no estriado, e de ação estimulatória (FERRÉ; CIRUELA, 2019). Tem sido bem estabelecido que, além de sua co-localização estrutural, os A2AR apresentam uma interação funcional com os receptores dopaminérgicos D2, assim como há interação entre os receptores A1/D1 (FERRE et al., 2008), e devido a esta interação que a cafeína, em concentrações menores como as utilizadas em nosso protocolo (30 e 60 μ M), exerceria seu papel neuroprotetor em um modelo da DP induzido pela 6-OHDA. Enquanto em concentrações maiores, o mecanismo inibitório da enzima fosfodiesterase não preveniria a neurodegeneração dopaminérgica induzida pela neurotoxina utilizada em nosso trabalho. Este resultado corrobora com dados observados em estudos epidemiológicos e randomizados já citados anteriormente (ASCHERIO et al., 2004; KIM et al., 2017), em que o consumo

moderado de cafeína foi inversamente associado ao risco de desenvolvimento da DP, enquanto uma ingestão superior de cafeína não demonstrou os mesmos benefícios.

8 CONCLUSÃO

Em suma, neste primeiro capítulo conclui-se que o modelo *in vitro* de 6-OHDA é reprodutível, e, portanto, uma ferramenta importante que pode ser utilizada para guiar futuros experimentos *in vivo*, e que a co-incubação com cafeína protege da redução de viabilidade celular induzida pela 6-OHDA nas fatias de estriado, embora os mecanismos envolvidos não puderam ser elucidados.

CAPÍTULO II

Investigação do envolvimento da SUMOilação no efeito neuroprotetor da cafeína

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A partir dos resultados obtidos no item 9.2 deste capítulo, uma revisão em forma de artigo foi elaborada para explorar os mecanismos moleculares clássicos da cafeína, e do possível envolvimento da SUMOilação, e o tópico referente a este tema encontra-se descrito no item 10.1

9.2 GPS-SUMO – ANÁLISE INTERAÇÃO SUMO X A2AR

Software utilizado para análise de sítios de ligação a SUMO (SIMs) em proteínas de interesse.

10 RESULTADOS

10.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Efeitos neuroprotetores da cafeína em modelos experimentais da doença de Parkinson: mecanismos moleculares

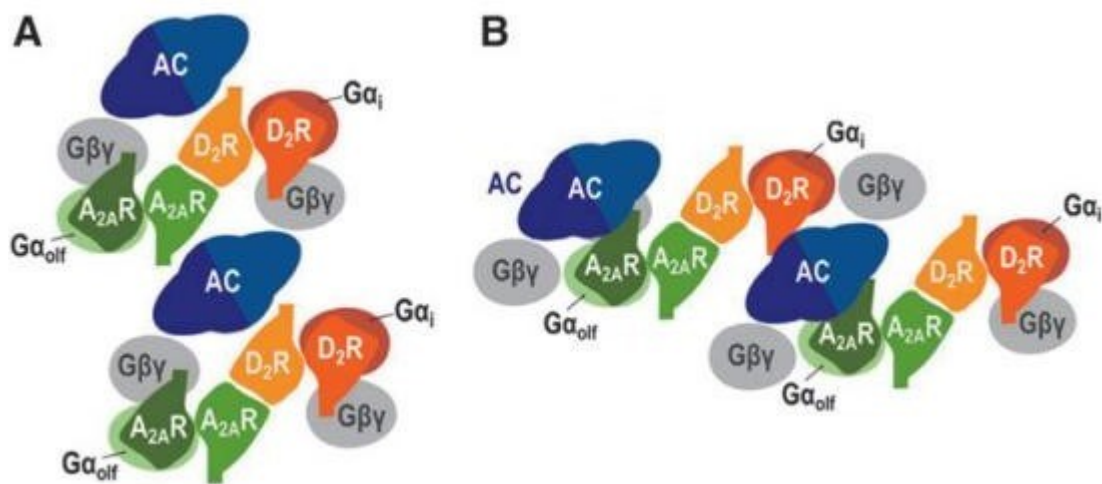
10.2 MECANISMOS NEUROPROTETORES CLÁSSICOS DA CAFEÍNA

As alterações moleculares observadas em diferentes modelos de DP sugerem que os efeitos da cafeína dependem tanto de sua atividade antioxidante quanto do antagonismo do A2AR que resulta no aumento da liberação de dopamina, interações antagônicas com os receptores D2 e pode prevenir a neuroinflamação e a excitotoxicidade (FERRÉ et al., 2018). As consequências funcionais desse antagonismo não seletivo de A2AR, que é um mecanismo de ação amplamente aceito para a cafeína, têm sido o foco de intensas pesquisas nos últimos anos. Em preparações de membrana de estriado de rato, a estimulação de A2AR reduz a

afinidade dos locais de ligação do agonista do receptor de dopamina (D2R) (FERRÉ et al., 1991). Esta é a interação receptor-receptor mais forte no local de ligação e poderia explicar os efeitos neurolépticos dos agonistas da adenosina e a atividade locomotora aumentada dos antagonistas da adenosina, como a cafeína (FERRÉ et al., 1991). A liberação de dopamina pelo bloqueio do A2AR foi extensivamente estudada como um mecanismo de neuroproteção da cafeína. Os receptores de adenosina compreendem um grupo de receptores acoplados à proteína G (GPCRs) (SHETH et al., 2014) e a descoberta de que os GPCRs podem operar como complexos de receptor, e não apenas como monômeros, sugere que vários sinais de entrada diferentes já podem ser integrados no nível da membrana plasmática por meio de interações alostéricas diretas entre os protômeros que formam o complexo (GUIDOLIN et al., 2019). Vários estudos demonstraram uma interação entre A2AR e D2R (FRANCO et al., 2001; FERRÉ 2008; VOICULESCO et al., 2014; VALLE-LEÓN et al., 2021), e que a interação direta proteína-proteína melhora as mudanças conformacionais que constituem um primeiro nível de regulação do receptor (CANALS et al., 2003). Os primeiros estudos enfatizaram essa interação no nível da membrana estriatal (FERRÉ et al., 1997), e em um modelo experimental de DP, o prejuízo do reconhecimento social induzido pela reserpina foi atenuado pela cafeína ou pelo quinpirole (agonista D2) (PREDIGER et al., 2005), reforçando a noção de interações antagônicas entre os receptores de adenosina e dopamina. A administração sistêmica de cafeína (10 e 30 mg/kg) pode preferencialmente aumentar os níveis extracelulares de dopamina e glutamato no *nucleo accumbens* (NAc), esses efeitos da cafeína eram específicos da dose e da região (SOLINAS et al., 2002). Além disso, o tratamento crônico com cafeína em um modelo de transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH) foi eficaz na diminuição da densidade do transportador de dopamina (DAT) nos terminais frontocortical e estriatal (PANDOLFO et al. 2012). O DAT controla a dinâmica espacial e temporal da neurotransmissão dopaminérgica, conduzindo a recaptção da dopamina extracelular para os neurônios pré-sinápticos (VAUGHAN & FOSTER., 2013). Mais recentemente, a existência de heterômeros A2AR-D2R, ou seja, oligômeros de receptores distintos, foi demonstrada no estriado de animais controle, utilizando uma combinação de microscopia imunoeletrônica, ensaio de ligação de proximidade e FRET (FERNÁNDEZ-DUEÑAS., 2015). Além disso, a avaliação de hemisférios de ratos lesionados unilateralmente por 6-OHDA demonstrou uma redução na co-distribuição e proximidade de imunopartículas para D2R e A2AR (FERNÁNDEZ-DUEÑAS., 2015). Uma interação alostérica inesperada no heterômero A2AR-D2R demonstrou contribuir

para o mecanismo da cafeína nos neurônios do estriado, desafiando assim a ideia de que a cafeína era simplesmente um inibidor competitivo da ligação da adenosina ao A2AR (BONAVENTURA et al., 2015). Este heterômero A2AR – D2R é composto de homodímeros A2AR e D2R com as quatro unidades receptoras (protômeros) formando um arranjo linear; os dois protômeros internos A2AR e D2R formam a interface heteromérica e os dois protômeros externos se acoplam a uma subunidade de suas respectivas proteínas G cognatas. Este arranjo permite o pré-acoplamento do heterotetrâmero com o efetor adenilato ciclase tipo 5 (AC5) (para revisão ver; NAVARRO et al., 2018; FERRÉ & CIRUELA., 2019).

Figura 5: Complexo Heterotetrâmero A2AR-D2-AC5



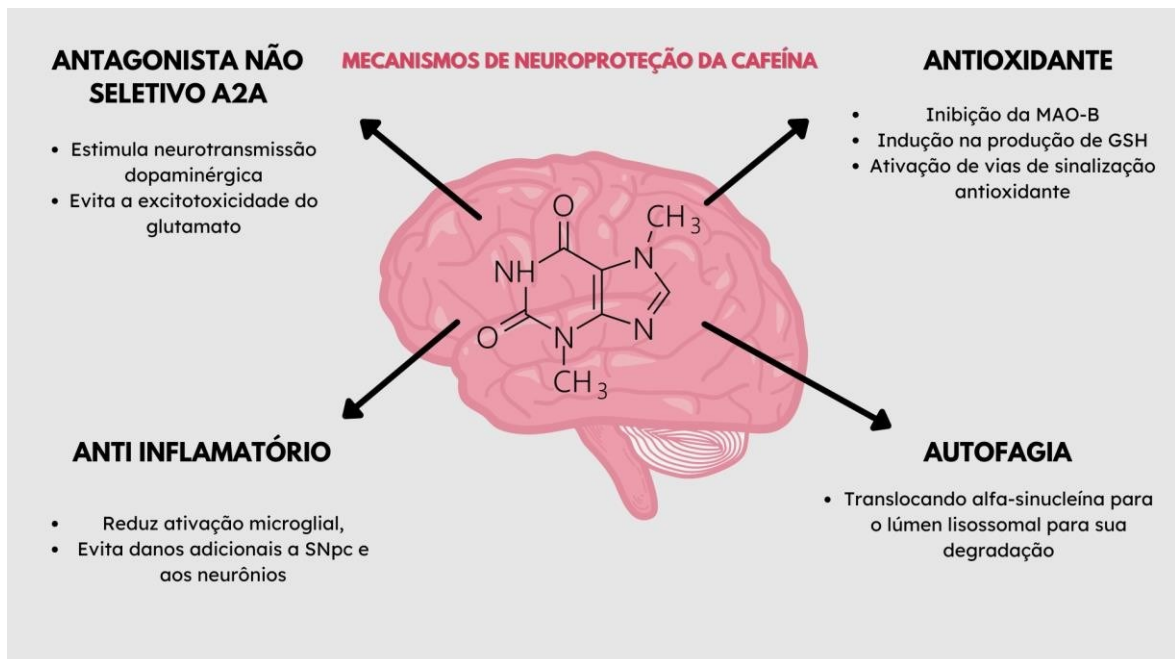
Representação esquemática de fatias, vistas do lado extracelular, da unidade funcional mínima do Heterotetrâmero A2AR-D2R em complexo com Gs (mais especificamente Golf) e proteínas Gi e adenil ciclase (subtipo AC5), na ausência (A) e na presença (B) de Agonistas A2AR e D2R, que induzem um rearranjo das interfaces do heterotetrâmero-AC5 (modificado de Ferré et al. 2018).

Quando a adenosina se liga a A2AR e A2BR, ela ativa as proteínas Gs e induz um aumento na atividade de AC, cAMP e PKA, promovendo assim um aumento no cálcio intracelular que culmina na liberação de glutamato (para revisão ver SCHEPICI et al., 2020). Por outro lado, no A2AR localizado em neurônios do estriado e / ou SNpc, a cafeína evita a excitotoxicidade do glutamato ao bloquear a ligação da adenosina aos seus receptores que desregula a ativação de PKA, causando um menor aumento nos níveis de cálcio intracelular e, assim, diminuindo a liberação de glutamato (SONSALLA et al., 2012). Em um modelo da DP induzido pela administração de MPTP em camundongos, a perda da função motora e a redução da atividade metabólica dos neurônios glutamatérgicos foram observadas no córtex cerebral,

estriado e bulbo olfatório (BAGGA et al., 2016). Além disso, a atividade dos neurônios gabaérgicos diminuiu significativamente em todas as regiões do cérebro, exceto no corpo estriado, onde foi ligeiramente reduzida nos camundongos que receberam MPTP. O pré-tratamento com cafeína melhorou parcialmente a função motora e foi capaz de normalizar as atividades neuronais excitatórias e inibitórias. Além disso, na maioria das regiões do cérebro, a cafeína protegeu parcialmente contra a neurotoxicidade induzida pelo MPTP (BAGGA et al., 2016).

Adicionalmente, a cafeína também pode ter como alvo os A2ARs localizados nos astrócitos, reduzindo assim sua atividade e controlando o nível de neuroinflamação causada por astrócitos próximo aos neurônios dopaminérgicos (PIERRI et al., 2005). Acredita-se que a microglia ativada contribua para o dano neuronal por meio da liberação de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina 1 β (IL-1 β), EROs, proteases, eicosanóides e aminoácidos excitatórios (LUCIN et al., 2009). A cafeína reduz a ativação microglial e a liberação de citocinas e radicais livres, bloqueando os A2ARs e reduzindo a liberação de glutamato, evitando danos adicionais à da substância negra pars compacta (SNpc) e aos neurônios do estriado (MORELLI et al., 2009). A cafeína pode inibir a peroxidação lipídica e reduzir a produção de EROs (DEVASAGAYAM ET AL., 1996). De fato, especificamente em modelos de DP, a cafeína pode inibir a monoamina oxidase-B (MAO-B) que catalisa a oxidação da dopamina e gera H₂O₂ (COHEN et al., 1990; PETZER et al., 2013). Além disso, a cafeína pode proteger os neurônios induzindo a síntese de glutathione (GSH) por meio do aumento da captação de cisteína (AOYAMA et al., 2011), atuando no nível antioxidante. Ainda, a cafeína pode proteger os neurônios dopaminérgicos ativando as vias de sinalização antioxidante, como o fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2 (Nrf2) -Keap1 e coativador-1 do receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1) (ZHOU et al., 2019). Estudos anteriores demonstraram que o fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf2) é essencial para a resposta celular ao estresse oxidativo (NGUYEN et al., 2003; WAKABAYASHI ET AL., 2004). Na figura abaixo, estão descritos os principais mecanismos de neuroproteção da cafeína, citados anteriormente neste item.

Figura 6: Mecanismos clássicos associados a neuroproteção da cafeína



Legenda: Resumo dos mecanismos de neuroproteção da cafeína encontrados na literatura: Antagonista não seletivo A2A; Antiinflamatório; Antioxidante; Autofagia.

10.3 SUMOILAÇÃO DE PROTEÍNAS COMO POTENCIAL MECANISMO NEURPROTETOR DA CAFEÍNA NA DP

Apesar de suas semelhanças e funções sobrepostas com a ubiquitinação, o processo de SUMOilação tem características especiais que o diferenciam, e suas capacidades funcionais vão muito além de fornecer uma camada adicional de regulação e complexidade para degradação proteossomal (CALEN & SAHIN., 2020). SUMO é uma proteína de ~11 kDa que é covalentemente conjugada a resíduos de lisina em proteínas alvo (JUNQUEIRA et al., 2018), e para isso a proteína SUMO é processada por uma protease para expor um resíduo de diglicina (-GG), produzindo o peptídeo. A SUMO madura é ligada a um complexo E1 heterodimérico (SAE1 / UBA2), que por sua vez catalisa a transferência do peptídeo para a enzima E2 central (UBC9). A enzima E2 pode então catalisar diretamente a ligação de SUMO ao substrato ou, alternativamente, pode recrutar uma enzima E3 adicional para conferir especificidade de substrato adicional. A desconjugação da SUMO pode então ser catalisada por proteases SUMO (SENP), tornando a SUMOilação uma modificação reversível. A SUMOilação resulta em

alterações bioquímicas em seu substrato, que por sua vez podem afetar processos celulares e fisiológicos como resposta ao estresse, integridade nuclear e transcrição, senescência celular e apoptose e, portanto, pode contribuir para estados de saúde e doença como envelhecimento e neurodegeneração (CALEN & SAHIN., 2020). As moléculas de SUMO também sofrem interações não covalentes com proteínas contendo um trecho curto de aminoácidos cercado por resíduos hidrofóbicos chamados motivos de interação de SUMO (SIMs) (SONG et al., 2004; LANG et al., 2016). Em resumo, os SIMs formam uma fita β que interage em uma orientação paralela ou antiparalela com a fita $\beta 2$ da SUMO. As sequências SIM ligam-se com baixa afinidade a SUMO com uma constante de dissociação variando de 5 a 10 μM (SONG et al., 2005; HECKER et al., 2006). Vários substratos e enzimas SUMO que regulam os níveis de SUMOilação contêm SIMs. Dois desses exemplos são as ligases SUMO da família PIAS (inibidor de proteína do transdutor de sinal STAT ativado e ativador da transcrição) e a ubiquitina ligase alvo SUMO RNF4 (dedo anular proteína 4) (JACKSON PK, 2001; SCHMIDT & MÜLLER., 2002; UZUNOVA ET AL., 2007; TATHAM ET AL., 2008).

A identificação de novas proteínas contendo SIMs pode ser importante para entender melhor os mecanismos regulatórios dependentes de SUMO (LANG et al., 2016). Acredita-se que a SUMOilação desempenhe um papel neuroprotetor em doenças neurodegenerativas (para revisão, consulte SILVEIRINHA; STEPHENS; CIMAROSTI, 2013; HENLEY et al., 2014; ANDERSON et al., 2017; HENLEY et al., 2020), mas suas consequências funcionais são ainda mal compreendidas.

Estudos anteriores sugeriram o possível envolvimento da sinalização adenosinérgica na modulação da SUMOilação. Liu e colegas (2009) descreveram um mecanismo pelo qual a sinalização de adenosina resulta em um acúmulo significativo de I κ B α modificado com SUMO-1, com subsequente atenuação da ativação de NF κ B. I κ B α é um membro de uma família de proteínas celulares que podem inibir o fator de transcrição NF κ B, que é um complexo proteico que controla a transcrição de DNA, produção de citocinas e sobrevivência celular (PERKINS, 2007).

Em modelos *in vitro* e *in vivo* de hipóxia seguida por reoxigenação (H / R), a incapacidade de gerar adenosina extracelular afeta significativamente os níveis de SUMO1 / I κ B α e a regulação da transcrição mediada por NF κ B. Além disso, eles demonstram um aumento dependente da dose em I κ B α / SUMO em células tratadas com um agonista do receptor de adenosina (NECA), que foi abolido pelo antagonista do receptor de adenosina (LIU et., 2009).

De fato, eles demonstraram um mecanismo endógeno pelo qual células e tecidos adquirem propriedades antiinflamatórias quando a adenosina e os agonistas dos receptores de adenosina aumentam a conjugação de SUMO1 ao I κ B α , evitando sua degradação proteossomal e resultando na inativação do NF κ B. Além disso, um estudo recente de nosso grupo avaliou se a guanosina, um nucleosídeo endógeno com potencial efeito neuroprotetor, pode modular a SUMOilação de proteínas globais em neurônios e astrócitos por meio de receptores de adenosina (ZANELLA et al., 2020). A guanosina aumentou a conjugação de SUMO 2 / 3 global em astrócitos e neurônios, e a co-incubação com o antagonista do receptor de adenosina A1 DPCPX aboliu esse efeito. Portanto, esses resultados sugerem que a atividade do receptor de adenosina é necessária para os efeitos da guanosina na promoção da SUMOilação em neurônios (ZANELLA et al., 2020).

Em vista dessas descobertas, hipotetizamos que a SUMOilação pode representar um importante mecanismo molecular associado aos efeitos neuroprotetores da cafeína na doença de Parkinson. Além disso, utilizando programas que prevêem a probabilidade da sequência de consenso SUMO estar envolvida, identificamos uma possível interação entre SUMO e A2AR (GPS-SUMO), conforme demonstrado na Figura 7 abaixo.

Homo sapiens

>Adenosine A2a receptor [Hs]

MPIMGSSVYITVELAIAVLA^{LG}NVLVCWAVWLNSNLQNVTNYFVVS^{LAAADIA}VG
^{VLA}IPFAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLAIAIDRYLA^{IRI}PLRYNGLVTG
 TRAKGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPKEGKNHSQGC^{GEGQV}ACLFEDVVPM
 NYMVYFNFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERARSTLQKEVH
 AAKSLAIIVGLFALCWLP^{LHIN}CFTFFCPDCSHAPLWLMYLAIVLSHTNSV^{VN}PFIYA
 YRIREFRQTFRKIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLA^{AHGSDGEQV}SLRLNGHPPGVW
 ANGSAPHPERRPNGYALGLVSGGSAQESQGNTGLPDVELLSHELK^{GVC}PEPPGLDDP
 LAQDGAGVS

Rattus norvegicus

>Adenosine A2a receptor [Rn]

MGSSVYITVELAIAV LAILG NVLVCWAVWINSNLQNVTNFFVVS LAAADIA VGV LAI
 PFAITISTGFCAACHGCLFFACFVLVLTQSSIFSL LAIAIDRY LAIRI PLRYNGLVTGVRA
 KGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCSQKDG NSTKTCGEGRV TCLFEDV VPMNYMVY
 YNFFAFVLLPLLMLAIYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERTRSTLQKEVHAAKSLAII
 VGLFALCWLP LHIIN CFTFFCSTCRHAPPWLMYLA IILSHSNSV VNPFIYAYRIREFRQT
 FRKIIRTHVLRREQEPFQAGGSSAWALAAHSTEGEQVSLRLNGHPLGVWANGSATHSG
 RRPNGYTLGLGGGSAQGS PRDVELPTQERQEGQEHPGLRGHLVQARVGASSWSSE
 FAPS

Mus musculus

>Adenosine A2a receptor [Mm]

MGSSVYIMVELAIAV LAILG NVLVCWAVWINSNLQNVTNFFVVS LAAADIA VGV LAI
 PFAITISTGFCAACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSL LAIAIDRY LAIRI PLRYNGLVTGMKA
 KGIIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCSQTDENSTKTCGEGRV TCLFEDV VPMNYMVYY
 NFFAFVLLPLLMLAIYLRIFLAARRQLKQMESQPLPGERTRSTLQKEVHAAKSLAIIV
 GLFALCWLP LHIIN CFTFFCSTCQHAPPWLMYLA IILSHSNSV VNPFIYAYRIREFRQTF
 RKIIRTHVLRREQEPFRAGGSSAWALAAHSTEGEQVSLRLNGHPLGVWANGSAPHSGR
 RPNGYTLGPGGGGSTQGSPGD VELLT QEHQEGQEHPGLGDHLA QGRVGTASWSSEF
 APS

Figura 7: Identificação dos sítios preditos de SUMO-interaction motifs (SIMs) nos genes codificantes para A2A

	SUMO Interaction				
	Ac	Sn	Sp	MCC	Pr
High	99.36%	52.98%	99.72%	0.5551	58.82%
Medium	98.84%	78.15%	99.00%	0.5364	37.46%
Low	97.12%	82.12%	97.24%	0.3818	18.51%

Legenda: Essa análise foi feita com GPS-SUMO e ela mostra que nos genes codificantes para receptor Adenosina A2A de humanos, ratos e comundongos foram identificados sítios preditos de SUMO-interaction motifs (SIMs) na sequência aminoacídica dessas proteínas. Esses SIM apresentam scores de predição diferentes, sendo que são identificados com níveis de estringência diferentes do software. Todos que estão em verde e em amarelo foram identificados utilizando o valor de *cutoff* (de estringência) considerado "baixo" pelo programa, enquanto os em amarelo foram identificados também pela estringência "média", sendo assim, provavelmente mais confiáveis quanto a sua interação com SUMO.

O crosstalk entre a SUMOilação e a doença de Parkinson foi descrito a partir da identificação de que proteínas como α -sinucleína, Drp1, PINK1, Parkin, LRRK2, DJ1 e outras proteínas relacionadas à patogênese da doença de Parkinson são alvos de SUMOilação (JUNQUEIRA et al., 2018). Ao nível do SNC, é possível observar que a modificação na mesma proteína-alvo difere de acordo com a isoforma SUMO à qual está ligada (HENLEY et al., 2014; HENLEY et al., 2018). Além disso, vários estudos encontraram um aumento na SUMOilação ao modificar positivamente as proteínas envolvidas na doença de Parkinson (para revisão ver GUERRA DE SOUZA et al., 2016; ROTT et al., 2017; ANDERSON et al., 2017). Da mesma forma, como muitas disfunções mitocondriais foram associadas à patologia da doença de Parkinson, as proteínas mitocondriais foram identificadas como reguladas por SUMOilação (para revisão, consulte HE; CHENG; WANG, 2020). Por exemplo, a proteína relacionada à dinamina da membrana externa (DRP1), que é o principal regulador da fissão mitocondrial. A superexpressão de SUMO1 protege DRP1 da degradação e aumenta drasticamente o nível de fragmentação mitocondrial (HARDER et al., 2004). A SUMO2/3 também desempenha um papel importante, quando conjugado com DRP1, mantém o DRP1 no citosol e diminui a fissão mitocondrial (GUO et al., 2013).

Outra proteína mitocondrial envolvida na doença de Parkinson é a DJ-1. Níveis normais de SUMOilação são essenciais para DJ-1 desempenhar seus papéis na regulação da transcrição e do estresse oxidativo (SHINBO et al. 2006). Em modelos experimentais da doença de Parkinson, a utilização de neurotoxinas, como MPP+ e 6-OHDA, levam à inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, diminuindo o ATP e aumentando os níveis de EROs (GUERRA SOUZA et al., 2016). Evidências sugerem que a disfunção mitocondrial é desencadeada por estresse oxidativo em pacientes com a doença de Parkinson (para revisão, ver HE; CHEN; WENG, 2020).

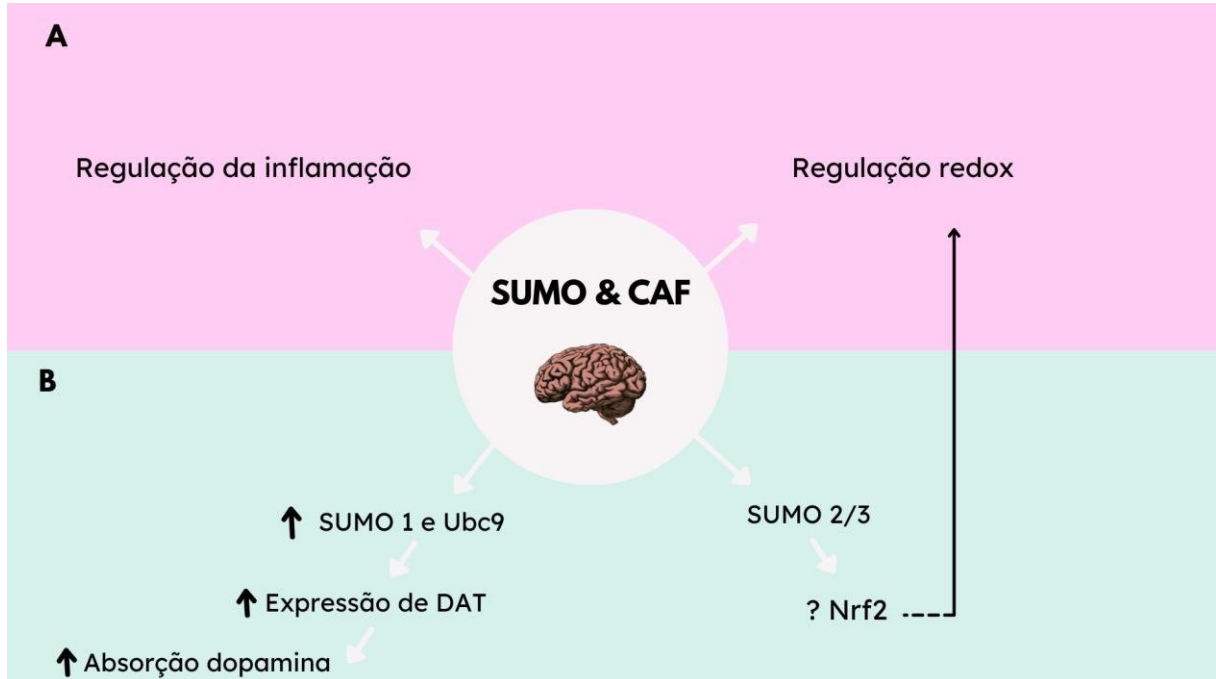
O papel da SUMOilação na regulação redox já foi demonstrado previamente (XU et al., 2009). Um estudo anterior mostrou que o fator nuclear 2 relacionado ao eritroide 2 (Nrf2) que é essencial para a resposta celular ao estresse oxidativo (NGUYEN et al., 2003; WAKABAYASHI et al., 2004) também é um alvo SUMO (MALLOY et al., 2013). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que Nrf2 polissumoilado pode sofrer ubiquitinação por RNF4 (RING finger protein 4) e então é degradado em corpos nucleares de leucemia promielocítica (PML-NBs) de uma maneira dependente de proteassoma.

A modulação da via Nrf2-Keap1 pode aumentar a expressão de um grupo de genes citoprotetores, incluindo genes antioxidantes e antiinflamatórios, bem como fatores de transcrição envolvidos na biogênese mitocondrial. Portanto, os fatores que modulam as vias de sinalização Nrf2-Keap1 e PGC1 podem proteger os neurônios dopaminérgicos contra a toxicidade observada na doença de Parkinson (CUADRADO et al., 2019; SUN et al., 2020). Outro estudo recente demonstrou a importância da SUMOilação na manutenção do equilíbrio redox mitocondrial por meio da regulação da atividade de IDH2 (YU et al., 2020). Isocitrato desidrogenases (IDHs) são enzimas metabólicas críticas que catalisam a descarboxilação oxidativa de isocitrato em α -cetoglutarato (α -KG) (ADLER et al., 1993). O IDH2 é essencial para as vias antioxidantes mitocondriais por meio da produção de NADPH, que é necessário para a regeneração da glutatona reduzida (GSH) (ADLER et al., 1993). Este estudo recente usando um modelo *in vitro* mostrou que a SUMOilação de IDH2 mantém a viabilidade celular sob estresse oxidativo, e o estresse oxidativo é responsável pela SUMOilação induzida de IDH2 (YU et al., 2020).

A inflamação tem sido associada ao processo neurodegenerativo na DP (CAGGIU et al., 2019). Vários estudos relacionam o papel da SUMOilação na regulação da inflamação (KROETZ et al., 2005; RAKESH et al., 2005). Um papel importante para a SUMOilação é regular a expressão da óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS2, também denominada NOS, iNOS) em astrócitos expostos ao lipopolissacarídeo de endotoxina bacteriana (LPS) (AKAR & FEINSTEIN., 2009). O óxido nítrico gerado por NOS2 contribui para a progressão da doença em uma variedade de doenças neurológicas, e sua expressão foi confirmada por muitos autores após indução inflamatória (GALEA et al., 1992; HEWETT et al., 1993; LEE et al., 1993).

Outro achado importante foi que a superexpressão de SUMO1 e da SUMO-conjugase Ubc9 induz a SUMOilação de DAT, reduz a ubiquitinação e degradação de DAT, aumentando o nível de estado estacionário de DAT, o que determina um aumento na sua atividade funcional (CARTIER et al., 2019). Isso enfatiza o envolvimento da SUMO em mecanismos neuroprotetores relacionados à doença de Parkinson .

Figura 8: Alvos em comum para neuroproteção entre SUMOilação e cafeína na DP



Legenda: Na parte A da figura estão os dois principais efeitos que a SUMOilação de proteínas e a cafeína tem em comum. Na parte B estão dois potenciais alvos da SUMO que estão relacionados com a neuroproteção conferida pela cafeína. A superexpressão de SUMO e da enzima Ubc9 induz a SUMOilação de DAT, o que aumenta funcionalidade desse transportador, aumentando a absorção de dopamina que será reutilizada. O Nrf2 foi reconhecido como alvo de SUMOilação, ainda sem esclarecimento de quais as consequências dessa interação, entretanto sabe-se que Nrf2 desempenha um papel importante na regulação redox, já associado a neuroproteção conferida pela cafeína. Transportador de dopamina, DAT; o fator nuclear 2 relacionado ao fator eritróide 2, Nrf2; enzima conjugase E2 central, Ubc9.

11 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados preliminares obtidos através de ferramentas de bioinformática e da revisão da literatura sugerem um possível envolvimento da SUMOilação na neuroproteção conferida pela cafeína na doença de Parkinson através da interação entre proteínas SUMO e o receptor A2A, o que ainda precisa ser explorado experimentalmente. As especulações feitas a partir da revisão bibliográfica no presente capítulo, abrem diversas possibilidades de pesquisas acerca do crosstalk entre SUMO e cafeína,

ainda não abordadas na literatura, que podem desvendar novas intervenções farmacológicas para doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson.

12 REFERÊNCIAS

- ADLER, Lenard A. et al. Vitamin E treatment of tardive dyskinesia. *The American journal of psychiatry*, 1993.
- AGUIAR, Lissiana Magna Vasconcelos et al. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 84, n. 3, p. 415-419, 2006.
- AKAR, Candan A.; FEINSTEIN, Douglas L. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by sumoylation. *Journal of neuroinflammation*, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2009.
- ANDERSON, Dina B. et al. Sumoylation: implications for neurodegenerative diseases. *SUMO Regulation of Cellular Processes*, p. 261-281, 2017.
- AOYAMA, K. et al. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience*, v. 181, p. 206-215, 2011.
- AOYAMA, K. et al. Caffeine and uric acid mediate glutathione synthesis for neuroprotection. *Neuroscience*, v. 181, p. 206-215, 2011.
- ASCHERIO, Alberto et al. Coffee consumption, gender, and Parkinson's disease mortality in the cancer prevention study II cohort: the modifying effects of estrogen. *American journal of epidemiology*, v. 160, n. 10, p. 977-984, 2004.
- BAGGA, Puneet; PATEL, Anant B. Pretreatment of caffeine leads to partial neuroprotection in MPTP model of Parkinson's disease. *Neural regeneration research*, v. 11, n. 11, p. 1750, 2016.
- BAO, Li; AVSHALUMOV, Marat V.; RICE, Margaret E. Partial mitochondrial inhibition causes striatal dopamine release suppression and medium spiny neuron depolarization via H₂O₂ elevation, not ATP depletion. *Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 43, p. 10029-10040, 2005.
- BEAL, M. Flint. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, v. 58, n. 4, p. 495-505, 2005.

- BELVISI, Daniele et al. Risk factors of Parkinson disease: Simultaneous assessment, interactions, and etiologic subtypes. *Neurology*, v. 95, n. 18, p. e2500-e2508, 2020.
- BERNSTOCK, Joshua D. et al. Topotecan is a potent inhibitor of SUMOylation in glioblastoma multiforme and alters both cellular replication and metabolic programming. *Scientific reports*, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.
- BLANDINI, Fabio et al. Time-course of nigrostriatal damage, basal ganglia metabolic changes and behavioural alterations following intrastriatal injection of 6-hydroxydopamine in the rat: new clues from an old model. *European Journal of Neuroscience*, v. 25, n. 2, p. 397-405, 2007.
- BLANDINI, Fabio; ARMENTERO, Marie-Therese; MARTIGNONI, Emilia. The 6-hydroxydopamine model: news from the past. *Parkinsonism & related disorders*, v. 14, p. S124-S129, 2008.
- BLUM, David et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, v. 65, n. 2, p. 135-172, 2001.
- BONAVENTURA, Jordi et al. Allosteric interactions between agonists and antagonists within the adenosine A2A receptor-dopamine D2 receptor heterotetramer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 27, p. E3609-E3618, 2015.
- BOVÉ, Jordi; PERIER, Céline. Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, v. 211, p. 51-76, 2012.
- BURKARD, W. P.; JALFRE, M.; BLUM, J. Effect of 6-hydroxydopamine on behaviour and cerebral amine content in rats. *Experientia*, v. 25, n. 12, p. 1295-1296, 1969.
- CAGGIU, Elisa et al. Inflammation, infectious triggers, and Parkinson's disease. *Frontiers in neurology*, v. 10, p. 122, 2019.
- CANALS, Meritxell et al. Adenosine A2A-dopamine D2 receptor-receptor heteromerization: qualitative and quantitative assessment by fluorescence and bioluminescence energy transfer. *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 47, p. 46741-46749, 2003.
- CARTIER, Etienne et al. The SUMO-conjugase Ubc9 prevents the degradation of the dopamine transporter, enhancing its cell surface level and dopamine uptake. *Frontiers in cellular neuroscience*, v. 13, p. 35, 2019.
- CHEN, Jiang-Fan et al. Neuroprotection by caffeine and A2A adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroscience*, v. 21, n. 10, p. RC143-RC143, 2001.

- CHEN, Xuesong et al. Caffeine protects against MPTP-induced blood-brain barrier dysfunction in mouse striatum. *Journal of neurochemistry*, v. 107, n. 4, p. 1147-1157, 2008.
- COHEN, G. Monoamine oxidase and oxidative stress at dopaminergic synapses. In: *Amine Oxidases and Their Impact on Neurobiology*. Springer, Vienna, 1990. p. 229-238.
- COSTENLA, Ana Rita; CUNHA, Rodrigo A.; DE MENDONÇA, Alexandre. Caffeine, adenosine receptors, and synaptic plasticity. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 20, n. s1, p. S25-S34, 2010.
- CUADRADO, Antonio et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nature reviews Drug discovery*, v. 18, n. 4, p. 295-317, 2019.
- DEUMENS, Ronald; BLOKLAND, Arjan; PRICKAERTS, Jos. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Experimental neurology*, v. 175, n. 2, p. 303-317, 2002.
- DEVAN, Bryan D.; HONG, Nancy S.; MCDONALD, Robert J. Parallel associative processing in the dorsal striatum: segregation of stimulus–response and cognitive control subregions. *Neurobiology of learning and memory*, v. 96, n. 2, p. 95-120, 2011.
- DEVASAGAYAM, T. P. A. et al. Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1282, n. 1, p. 63-70, 1996.
- DEXTER, David T.; JENNER, Peter. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 62, p. 132-144, 2013.
- FEARNLEY, Julian M.; LEES, Andrew J. Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity. *Brain*, v. 114, n. 5, p. 2283-2301, 1991.
- FERNÁNDEZ-DUEÑAS, Víctor et al. Untangling dopamine-adenosine receptor-receptor assembly in experimental parkinsonism in rats. *Disease models & mechanisms*, v. 8, n. 1, p. 57-63, 2015.
- FERRÉ, Sergi et al. Adenosine–dopamine receptor–receptor interactions as an integrative mechanism in the basal ganglia. *Trends in neurosciences*, v. 20, n. 10, p. 482-487, 1997.
- FERRE, Sergi et al. An update on adenosine A2A-dopamine D2 receptor interactions: implications for the function of G protein-coupled receptors. *Current pharmaceutical design*, v. 14, n. 15, p. 1468-1474, 2008.

- FERRÉ, Sergi et al. New developments on the adenosine mechanisms of the central effects of caffeine and their implications for neuropsychiatric disorders. *Journal of caffeine and adenosine research*, v. 8, n. 4, p. 121-130, 2018.
- FERRE, Sergi et al. Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 16, p. 7238-7241, 1991.
- FERRÉ, Sergi. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of neurochemistry*, v. 105, n. 4, p. 1067-1079, 2008.
- FERRÉ, Sergi; CIRUELA, Francisco. Functional and neuroprotective role of striatal adenosine A2A receptor heterotetramers. *Journal of caffeine and adenosine research*, v. 9, n. 3, p. 89-97, 2019.
- FERRÉ, Sergi; CIRUELA, Francisco. Functional and neuroprotective role of striatal adenosine A2A receptor heterotetramers. *Journal of caffeine and adenosine research*, v. 9, n. 3, p. 89-97, 2019.
- FLOTHO, Annette; MELCHIOR, Frauke. Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease. *Annual review of biochemistry*, v. 82, p. 357-385, 2013.
- FRANCO, Rafael et al. Adenosine/dopamine receptor-receptor interactions in the central nervous system. *Drug development research*, v. 52, n. 1-2, p. 296-302, 2001.
- GALEA, Elena; FEINSTEIN, Douglas L.; REIS, Donald J. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 89, n. 22, p. 10945-10949, 1992.
- GERFEN, Charles R.; SURMEIER, D. James. Modulation of striatal projection systems by dopamine. *Annual review of neuroscience*, v. 34, p. 441-466, 2011.
- GEVAERD, Monique S. et al. Caffeine reverses the memory disruption induced by intra-nigral MPTP-injection in rats. *Brain Research Bulletin*, v. 55, n. 1, p. 101-106, 2001.
- GIULIANI, Patricia et al. Guanosine protects glial cells against 6-hydroxydopamine toxicity. In: *Neurotransmitter Interactions and Cognitive Function*. Springer, Cham, 2014. p. 23-33.
- GONÇALVES, Débora F. et al. 6-Hydroxydopamine induces different mitochondrial bioenergetics response in brain regions of rat. *Neurotoxicology*, v. 70, p. 1-11, 2019.
- GONZÁLEZ, Pablo A. Iglesias et al. In vitro 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity: New insights on NFκB modulation. *Toxicology in Vitro*, v. 60, p. 400-411, 2019.
- GUIDOLIN, Diego et al. Receptor-receptor interactions as a widespread phenomenon: novel targets for drug development?. *Frontiers in endocrinology*, v. 10, p. 53, 2019.

- GUO, Chun et al. SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *The EMBO journal*, v. 32, n. 11, p. 1514-1528, 2013.
- GUTHRIE, Martin et al. Interaction between cognitive and motor cortico-basal ganglia loops during decision making: a computational study. *Journal of neurophysiology*, v. 109, n. 12, p. 3025-3040, 2013.
- HENLEY, Jeremy M.; CARMICHAEL, Ruth E.; WILKINSON, Kevin A. Extranuclear SUMOylation in neurons. *Trends in neurosciences*, v. 41, n. 4, p. 198-210, 2018.
- HENLEY, Jeremy M.; CRAIG, Tim J.; WILKINSON, Kevin A. Neuronal SUMOylation: mechanisms, physiology, and roles in neuronal dysfunction. *Physiological reviews*, v. 94, n. 4, p. 1249-1285, 2014.
- HEUER, Andreas; DUNNETT, Stephen B. Unilateral 6-OHDA Lesions Induce Lateralised Deficits in a 'Skinner box' Operant Choice Reaction Time Task in Rats. *Journal of Parkinson's disease*, v. 2, n. 4, p. 309-320, 2012.
- HEWETT, Sandra J. et al. Inhibition of nitric oxide formation does not protect murine cortical cell cultures from N-methyl-D-aspartate neurotoxicity. *Brain research*, v. 625, n. 2, p. 337-341, 1993.
- JUNQUEIRA, Stella C. et al. Post-translational modifications of Parkinson's disease-related proteins: Phosphorylation, SUMOylation and Ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1865, n. 8, p. 2001-2007, 2019.
- KAPLAN, Gary B. et al. Caffeine-induced behavioural stimulation is dose-and concentration-dependent. *British journal of pharmacology*, v. 100, n. 3, p. 435, 1990.
- KHADRAWY, Yasser A. et al. Neuroprotective and therapeutic effect of caffeine on the rat model of Parkinson's disease induced by rotenone. *Journal of dietary supplements*, v. 14, n. 5, p. 553-572, 2017.
- KIM, Iris Y. et al. Differences in Parkinson's disease risk with caffeine intake and postmenopausal hormone use. *Journal of Parkinson's disease*, v. 7, n. 4, p. 677-684, 2017.
- KROETZ, Mary B. SUMO: a ubiquitin-like protein modifier. *The Yale journal of biology and medicine*, v. 78, n. 4, p. 197, 2005.
- KUPSCH, Andreas et al. 6-Hydroxydopamine impairs mitochondrial function in the rat model of Parkinson's disease: respirometric, histological, and behavioral analyses. *Journal of Neural Transmission*, v. 121, n. 10, p. 1245-1257, 2014.

- LANG, Valérie et al. Using biotinylated SUMO-traps to analyze SUMOylated proteins. In: SUMO. Humana Press, New York, NY, 2016. p. 109-121.
- LE FEBER, Joost. In Vitro Models of Brain Disorders. In Vitro Neuronal Networks, p. 19-49, 2019.
- LEE, Sunhee C. et al. Induction of nitric oxide synthase activity in human astrocytes by interleukin-1. Nature, v. 443, n. 7113, p. 787-795, 2006.
- LIN, Michael T.; BEAL, M. Flint. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. Nature, v. 443, n. 7113, p. 787-795, 2006.
- LIU, Yuanbin et al. Mechanism of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. Journal of neurochemistry, v. 69, n. 2, p. 581-593, 1997.
- LUAN, Yanan et al. Chronic caffeine treatment protects against α -synucleinopathy by reestablishing autophagy activity in the mouse striatum. Frontiers in neuroscience, v. 12, p. 301, 2018.
- LUAN, Yanan et al. Chronic caffeine treatment protects against α -synucleinopathy by reestablishing autophagy activity in the mouse striatum. Frontiers in neuroscience, v. 12, p. 301, 2018.
- LUCIN, Kurt M.; WYSS-CORAY, Tony. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little?. Neuron, v. 64, n. 1, p. 110-122, 2009.
- MACHADO-FILHO, João Ananias et al. Caffeine neuroprotective effects on 6-OHDA-lesioned rats are mediated by several factors, including pro-inflammatory cytokines and histone deacetylase inhibitions. Behavioural Brain Research, v. 264, p. 116-125, 2014.
- MALLOY, Melanie Theodore et al. Trafficking of the transcription factor Nrf2 to promyelocytic leukemia-nuclear bodies: implications for degradation of NRF2 in the nucleus. Journal of Biological Chemistry, v. 288, n. 20, p. 14569-14583, 2013.
- MARQUES, Naiani Ferreira; MASSARI, Caio Marcos; TASCA, Carla Inês. Guanosine protects striatal slices against 6-OHDA-induced oxidative damage, mitochondrial dysfunction, and ATP depletion. Neurotoxicity research, v. 35, n. 2, p. 475-483, 2019.
- MASSARI, Caio M. et al. In vitro 6-hydroxydopamine-induced toxicity in striatal, cerebrocortical and hippocampal slices is attenuated by atorvastatin and MK-801. Toxicology in Vitro, v. 37, p. 162-168, 2016.
- MATHEUS, Filipe C. et al. Temporal dissociation of striatum and prefrontal cortex uncouples anhedonia and defense behaviors relevant to depression in 6-OHDA-lesioned rats. Molecular neurobiology, v. 53, n. 6, p. 3891-3899, 2016.

- MEDEIROS, Márcio Schneider; SCHUMACHER-SCHUH, Artur Francisco; RIDER, Carlos Roberto de Mello. A case-control study of the effects of chimarrão (*Ilex paraguariensis*) and coffee on Parkinson's disease. *Frontiers in Neurology*, v. 12, p. 160, 2021.
- MORELLI, Micaela et al. Pathophysiological roles for purines: adenosine, caffeine and urate. *Progress in brain research*, v. 183, p. 183-208, 2010.
- MORELLI, Micaela; CARTA, Anna R.; JENNER, Peter. Adenosine A_{2A} receptors and Parkinson's disease. *Adenosine receptors in health and disease*, p. 589-615, 2009.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- NAVARRO, Gemma et al. Cross-communication between G_i and G_s in a G-protein-coupled receptor heterotetramer guided by a receptor C-terminal domain. *BMC biology*, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2018.
- NGUYEN, Truyen; SHERRATT, Philip J.; PICKETT, Cecil B. Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 43, n. 1, p. 233-260, 2003.
- NIEBER, Karen. The impact of coffee on health. *Planta medica*, v. 83, n. 16, p. 1256-1263, 2017.
- NOBRE JR, Helio Vitoriano et al. Caffeine and CSC, adenosine A_{2A} antagonists, offer neuroprotection against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rat mesencephalic cells. *Neurochemistry international*, v. 56, n. 1, p. 51-58, 2010.
- OBESO, Jose A. et al. Functional organization of the basal ganglia: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Movement disorders: official journal of the Movement Disorder Society*, v. 23, n. S3, p. S548-S559, 2008.
- PALACIOS, Natalia et al. Caffeine and risk of Parkinson's disease in a large cohort of men and women. *Movement Disorders*, v. 27, n. 10, p. 1276-1282, 2012.
- PANDOLFO, Pablo et al. Caffeine regulates frontocortico-striatal dopamine transporter density and improves attention and cognitive deficits in an animal model of attention deficit hyperactivity disorder. *European Neuropsychopharmacology*, v. 23, n. 4, p. 317-328, 2013.
- PETZER, Anél; PIENAAR, Anke; PETZER, Jacobus P. The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life sciences*, v. 93, n. 7, p. 283-287, 2013.

- PIERRI, Mette et al. KW-6002 protects from MPTP induced dopaminergic toxicity in the mouse. *Neuropharmacology*, v. 48, n. 4, p. 517-524, 2005.
- PORTER, Curt C.; TOTARO, James A.; STONE, Clement A. Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 140, n. 3, p. 308-316, 1963.
- POSTUMA, Ronald B. et al. Caffeine as symptomatic treatment for Parkinson disease (Café-PD): A randomized trial. *Neurology*, v. 89, n. 17, p. 1795-1803, 2017.
- POSTUMA, Ronald B. et al. Caffeine for treatment of Parkinson disease: a randomized controlled trial. *Neurology*, v. 79, n. 7, p. 651-658, 2012.
- PREDIGER, Rui DS. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. *Journal of Alzheimer's Disease*, v. 20, n. s1, p. S205-S220, 2010.
- PREDIGER, Rui DS; BATISTA, Luciano C.; TAKAHASHI, Reinaldo N. Caffeine reverses age-related deficits in olfactory discrimination and social recognition memory in rats: involvement of adenosine A1 and A2A receptors. *Neurobiology of aging*, v. 26, n. 6, p. 957-964, 2005.
- PREDIGER, Rui DS; FERNANDES, Daniel; TAKAHASHI, Reinaldo N. Blockade of adenosine A2A receptors reverses short-term social memory impairments in spontaneously hypertensive rats. *Behavioural brain research*, v. 159, n. 2, p. 197-205, 2005.
- PRZEDBORSKI, Serge. Inflammation and Parkinson's disease pathogenesis. *Movement Disorders*, v. 25, n. S1, p. S55-S57, 2010.
- RAKESH, Kriti; AGRAWAL, Devendra K. Controlling cytokine signaling by constitutive inhibitors. *Biochemical pharmacology*, v. 70, n. 5, p. 649-657, 2005.
- REYHANI-RAD, Siamak; MAHMOUDI, Javad. Effect of adenosine A2A receptor antagonists on motor disorders induced by 6-hydroxydopamine in rat1. *Acta cirurgica brasileira*, v. 31, p. 133-137, 2016.
- RODRIGUES PG, Barbosa CM, Silva CM, Teixeira SL, Cardoso F. O im-pacto de um programa de atividade física na qualidade de vida de pacientes com doença de Parkinson. *Rev bras fisioter* 2005.
- ROSS, G. Webster et al. Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *Jama*, v. 283, n. 20, p. 2674-2679, 2000.
- SCHEPICI, Giovanni et al. Caffeine: An Overview of Its Beneficial Effects in Experimental Models and Clinical Trials of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 13, p. 4766, 2020.
- SHETH, Sandeep et al. Adenosine receptors: expression, function and regulation. *International journal of molecular sciences*, v. 15, n. 2, p. 2024-2052, 2014.

- SHI, X.; DALAL, N. S.; JAIN, A. C. Antioxidant behaviour of caffeine: efficient scavenging of hydroxyl radicals. *Food and chemical toxicology*, v. 29, n. 1, p. 1-6, 1991.
- SILVEIRINHA, Vasco; STEPHENS, Gary J.; CIMAROSTI, Helena. Molecular targets underlying SUMO-mediated neuroprotection in brain ischemia. *Journal of neurochemistry*, v. 127, n. 5, p. 580-591, 2013.
- SIMOLA, Nicola; MORELLI, Micaela; CARTA, Anna R. The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, v. 11, n. 3, p. 151-167, 2007.
- SOLINAS, Marcello et al. Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *Journal of Neuroscience*, v. 22, n. 15, p. 6321-6324, 2002.
- SONG, Jing et al. Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 40, p. 14373-14378, 2004.
- SONSALLA, Patricia K. et al. Delayed caffeine treatment prevents nigral dopamine neuron loss in a progressive rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, v. 234, n. 2, p. 482-487, 2012.
- SONSALLA, Patricia K. et al. Delayed caffeine treatment prevents nigral dopamine neuron loss in a progressive rat model of Parkinson's disease. *Experimental neurology*, v. 234, n. 2, p. 482-487, 2012.
- SUBRAMANIAM, Sudhakar Raja; CHESSELET, Marie-Francoise. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease. *Progress in neurobiology*, v. 106, p. 17-32, 2013.
- SUN, Yiran et al. Activation of p62-Keap1-Nrf2 pathway protects 6-hydroxydopamine-induced ferroptosis in dopaminergic cells. *Molecular Neurobiology*, v. 57, n. 11, p. 4628-4641, 2020.
- THITHAPANDHA, Amnuay; MALING, Harriet M.; GILLETTE, James R. Effects of caffeine and theophylline on activity of rats in relation to brain xanthine concentrations. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v. 139, n. 2, p. 582-586, 1972.
- URETSKY, N. J.; IVERSEN, L. L. Effects of 6-hydroxydopamine on noradrenaline-containing neurones in the rat brain. *Nature*, v. 221, n. 5180, p. 557-559, 1969.
- VALLE-LEÓN, Marta et al. Decreased striatal adenosine A_{2A}-dopamine D₂ receptor heteromerization in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology*, v. 46, n. 3, p. 665-672, 2021.

VAN GELDER, B. M. et al. Coffee consumption is inversely associated with cognitive decline in elderly European men: the FINE Study. *European journal of clinical nutrition*, v. 61, n. 2, p. 226-232, 2007.

VAUGHAN, Roxanne A.; FOSTER, James D. Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends in pharmacological sciences*, v. 34, n. 9, p. 489-496, 2013.

VICENTE MIRANDA, Hugo et al. Glycation potentiates α -synuclein-associated neurodegeneration in synucleinopathies. *Brain*, v. 140, n. 5, p. 1399-1419, 2017.

VOICULESCU, M. et al. Molecular and pharmacodynamic interactions between caffeine and dopaminergic system. *Journal of medicine and life*, v. 7, n. Spec Iss 4, p. 30, 2014.

WAKABAYASHI, Nobunao et al. Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 101, n. 7, p. 2040-2045, 2004.

XU, Kui et al. Neuroprotection by caffeine in the MPTP model of parkinson's disease and its dependence on adenosine A2A receptors. *Neuroscience*, v. 322, p. 129-137, 2016.

YU, Yun et al. SUMOylation enhances the activity of IDH2 under oxidative stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 532, n. 4, p. 591-597, 2020.

ZHOU, Yanping et al. Recent advances of natural polyphenols activators for Keap1-Nrf2

SCHEPICI, Giovanni et al. Caffeine: An Overview of Its Beneficial Effects in Experimental Models and Clinical Trials of Parkinson's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 13, p. 4766, 2020. signaling pathway. *Chemistry & biodiversity*, v. 16, n.

11, p. e1900400, 2019.