

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MEIRA MARIA FORCELINI MACHADO

**AGONISTA DO PPAR- γ REDUZ A ATIVAÇÃO MICROGLIAL E A
EXPRESSÃO DO NF- κ B NA SUBSTÂNCIA NEGRA APÓS A INFUSÃO
DA 6-HIDROXIDOPAMINA COMO MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON**

CURITIBA

2016

MEIRA MARIA FORCELINI MACHADO

**AGONISTA DO PPAR- γ REDUZ A ATIVAÇÃO MICROGLIAL E A
EXPRESSÃO DO NF- κ B NA SUBSTÂNCIA NEGRA APÓS A INFUSÃO
DA 6-HIDROXIDOPAMINA COMO MODELO DE DOENÇA DE
PARKINSON**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, no Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Maria A. B. F. Vital.

CURITIBA

2016



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FARMACOLOGIA

No dia trinta de Setembro de dois mil e dezesseis às 14:00 horas, na sala ANFITEATRO 15, PRÉDIO PRINCIPAL, do Setor de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS da Universidade Federal do Paraná, foram instalados os trabalhos de arguição da mestranda **MEIRA MARIA FORCELINI MACHADO** para a Defesa Pública de sua Dissertação intitulada: "**EFEITO NEUROPROTETOR DA PIOGLITAZONA NO MODELO ANIMAL DA 6-OHDA DE DOENÇA DE PARKINSON**". A Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná, foi constituída pelos seguintes Membros: MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL (UFPR), MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA (UFPR), RONISE MARTINS SANTIAGO (UNIANDRADE). Dando início à sessão, a presidência passou a palavra a discente, para que a mesma expusesse seu trabalho aos presentes. Em seguida, a presidência passou a palavra a cada um dos Examinadores, para suas respectivas arguições. A aluna respondeu a cada um dos arguidores. A presidência retomou a palavra para suas considerações finais e, depois, solicitou que os presentes e a mestranda deixassem a sala. A Banca Examinadora, então, reuniu-se sigilosamente e, após a discussão de suas avaliações, decidiu-se pela APROVAÇÃO da aluna. A mestranda foi convidada a ingressar novamente na sala, bem como os demais assistentes, após o que a presidência fez a leitura do Parecer da Banca Examinadora. Nada mais havendo a tratar a presidência deu por encerrada a sessão, da qual eu, MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL, lavrei a presente ata, que vai assinada por mim e pelos membros da Comissão Examinadora.

Curitiba, 30 de Setembro de 2016.

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Avaliador Interno (UFPR)

RONISE MARTINS SANTIAGO
Avaliador Externo (UNIANDRADE)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós Graduação em FARMACOLOGIA
Código CAPES: 40001016038P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **MEIRA MARIA FORCELINI MACHADO**, intitulada: "**EFEITO NEUROPROTETOR DA PIOGLITAZONA NO MODELO ANIMAL DA 6-OHDA DE DOENÇA DE PARKINSON**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua

Aprovação.

Curitiba, 30 de Setembro de 2016.

MARIA APARECIDA BARBATO FRAZÃO VITAL
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO DE MEIRA SANTOS LIMA
Avaliador Interno (UFPR)

RONISE MARTINS SANTIAGO
Avaliador Externo (UNIANDRADE)

**A minha família, principalmente aos meus pais Inez Fátima Forcelini
Machado e Luiz Carlos Teicheira Machado.**

Por todo o amor, apoio, auxílio e incentivo em todos os momentos da minha
vida, mesmo com tanta distância entre nós.

Essa conquista é nossa!

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof^a Dr^a. Maria A. B. F. Vital por toda sabedoria, conselhos e companheirismo, sendo sempre muito solícita, compreensiva e paciente nos acolhendo com todo o seu amor fraternal. Muito obrigada!

Aos membros da banca pelo aceite e disponibilidade.

Ao departamento de Farmacologia da UFPR, funcionários e professores principalmente do SNC por todo o auxílio prestado.

A toda a minha família por sempre me apoiar e entender a minha ausência em muitas datas especiais, por ser o alicerce que me dá forças para ir adiante, por todas as rezas, ensinamentos, amor e animação que sempre me recuperou após cada experimento.

Ao meu amado companheiro Giuseppe Felipe Lunelli pelo consolo, incentivo e compreensão que tornou toda essa trajetória um pouco mais suave.

A todas as amigas consolidadas durante esses dois anos de Farmacologia pelo carinho e pelas conversas descontraídas permitindo um dia a dia mais leve, com muitas risadas, churrascos, babados e bate cabelo. Seria injusto citar nomes, pois poderia esquecer alguém e todo mundo tem um lugar especial no meu coração.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Eric Moura, Valentín Cóppola, Leonardo Castro, Paula Kempe, Joelle Melo e especialmente a Taysa Bervian Bassani que me ensinou tudo o que sei e tenho como amiga pra vida toda, tenho certeza que não faria metade do que fiz sem o seu aconselhamento.

Aos amigos da vida Mário Sérgio Braga do Couto e Tamara Camargo Silva pelo suporte, conselhos, dedicação, companhia, paciência, pelas conversas animadoras e pelas gargalhadas compartilhadas.

A cada um dos animais utilizados nos experimentos.

A maravilhosa Curitiba que me acolheu e me proporcionou momentos incríveis e inesquecíveis com pessoas magníficas e lugares marcantes.

Ao CNPq, CAPES e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente afetando cerca de 1% da população com mais de 60 anos. É caracterizada pela perda lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra pars compacta (SNpc), com redução dos terminais dopaminérgicos no estriado promovendo o surgimento dos sintomas motores. A neuroinflamação é um fator conhecido por favorecer a morte neuronal dopaminérgica, sendo observada uma intensa reativação microglial e astrogliar, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e ativação da via do NF- κ B na SNpc de pacientes em estágio avançado da DP. O receptor ativado por proliferadores de peroxissomas tipo gama (PPAR- γ) está envolvido na homeostase da glicose e no metabolismo lipídico, sendo que a sua ativação também promove efeitos anti-inflamatórios. A pioglitazona, um agonista desse receptor é uma droga utilizada no tratamento do diabetes tipo II, capaz de exercer efeitos neuroprotetores, protegendo contra a morte neuronal e reduzindo o processo inflamatório gerado na SN. O presente estudo investigou os efeitos do tratamento com pioglitazona em ratos submetidos à infusão intranigral da 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA). Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica, sendo iniciado o tratamento com a pioglitazona (pio, 30 mg/kg) ou veículo (veh) por gavagem aproximadamente 24 h após a cirurgia e realizado durante 5 dias. Os ratos, antes da primeira dose foram submetidos ao teste do campo aberto e foram reexpostos ao teste nos dias 7, 14 e 21 após a infusão da toxina. A 6-OHDA causou hipolocomoção nos animais 24 h após a infusão que foi mantida no grupo 6-OHDA+veh após 7 dias. Por outro lado, o grupo 6-OHDA+pio mostrou uma recuperação da atividade motora avaliada no 7º dia após a cirurgia. A 6-OHDA também causou redução da imunorreatividade à tirosina hidroxilase (TH-ir) na SNpc (37%), enquanto o grupo lesado tratado com a pioglitazona não mostrou alteração. Na SNpc dos ratos do grupo 6-OHDA+veh foi observado aumento na ativação (50%) e proliferação (79%) das células microgliais, com aumento da expressão e da ativação do NF- κ B (114%). Entretanto, no grupo 6-OHDA+pio houve um leve aumento na proliferação microglial (29%), com redução da ativação microglial e diminuição da expressão e ativação do NF- κ B. Com isso, esses resultados indicam que a pioglitazona exerceu um efeito neuroprotetore no modelo da 6-OHDA de DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, PPAR- γ , pioglitazona, neuroinflamação, NF- κ B

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second neurodegenerative disease most frequent affecting 1% of population over 60 years. It is characterized by slow and progressive loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta (SNpc) with reduction of dopaminergic terminals in the striatum and promotes the onset of motor symptoms. The neuroinflammation is a known factor for favor the dopaminergic neuronal death, being observed an intense microglial and astroglial reactivation with increase of the proinflammatory cytokines production and NF- κ B pathway activation in SNpc of patients in advanced stages of PD. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) is involved in glucose homeostasis and lipid metabolism that also promotes anti-inflammatory effects when it is activated. Pioglitazone, an agonist of this receptor is a drug used in the treatment of type II diabetes able to exert neuroprotective effects, protecting against the neuronal death and reducing the inflammatory process generated in the SN in PD. This study investigated the effects of pioglitazone therapy in rats submitted to intranigral infusion of 6-OHDA. Rats were submitted to stereotaxic surgery with infusion of 6-OHDA (6 μ g in 1 μ l LCR) directly in the SNpc, being started the pioglitazone treatment (pio, 30 mg/kg) or vehicle (veh) by gavage, approximately 24 hr after the surgery and performed for 5 days. The rats before of first treatment were submitted to the open field test 24 hr after the surgery and they were re-exposed to the test on days 7, 14 and 21 after the toxin infusion. The 6-OHDA caused a hypolocomotion in the rats 24 hr after the surgery that was maintained in the 6-OHDA+veh group after 7 days. On the other hand, 6-OHDA+pio group showed a recovery of motor activity on 7 days after surgery. The 6-OHDA also caused a reduction of immunoreactivity to tyrosine hydroxylase (TH-ir) in the SNpc (37%), while the injured group treated with pioglitazone did not showed difference. In the SNpc of rats pertaining to the 6-OHDA+veh group there was an increase in the microglial activation (50%) and proliferation (79%) with increase of NF- κ B expression and activation (114%). However, in the 6-OHDA+pio group there was a slight increase in the microglial proliferation (29%) with reduction of microglial activation and decrease of NF- κ B activation and expression. Thus, these results indicate that pioglitazone exerts a neuroprotective effect in the 6-OHDA model of PD.

Key-words: Parkinson's disease, PPAR- γ , pioglitazone, neuroinflammation, NF- κ B

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – 6-hidroxi-dopamina

BDNF – *Brain-derived neurotropic factor*

CL – Corpos de Lewy

COX-2 – Ciclooxygenase tipo 2

DA – Dopamina

DP – Doença de Parkinson

EROs – Espécies reativas de oxigênio

GDNF – *Glial-derived neurotrophic factor*

GFAP – *Glial fibrillary acidic protein*

GSH – Glutathione

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IL-1b – Interleucina 1 beta

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

MHC – Complexo de histocompatibilidade maior

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrapiridina

NF-κB – Fator de transcrição nuclear kappa B

NO – Óxido nítrico

PPAR-α – Receptor ativado por proliferador de peroxissomas tipo alfa

PPAR-β/δ – Receptor ativado por proliferador de peroxissomas tipo beta

PPAR-γ – Receptor ativado por proliferador de peroxissomas tipo gama

RXR – Receptor de ácido retinóico

SOD – Superóxido dismutase

SNC – Sistema nervoso central

SN – Substância negra

SNpc – Substância negra parts compacta

TNF-α – Tumor de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO A DOENÇA DE PARKINSON	11
1.1. NEUROINFLAMAÇÃO ASSOCIADA COM A PROGRESSÃO DA NEURODEGENERAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON	14
1.1.1. Ativação microglial	15
1.1.2. Reatividade astrocítica.....	17
1.1.3. Fator nuclear potenciador da cadeia leve kappa de células B ativadas (NF-κB)	18
1.2. Receptores ativados por proliferadores de peroxissomas (PPAR)	20
1.2.1. PPAR – γ	20
1.2.2. Agonistas sintéticos do PPAR – γ em modelos da DP	21
2. OBJETIVOS	24
2.1. OBJETIVO GERAL	24
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3. ARTIGO CIENTÍFICO	24
4. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO A DOENÇA DE PARKINSON

A doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra pars compacta (SNpc) com degeneração dos seus terminais nervosos e redução de dopamina (DA) no estriado (BLESA et al, 2012). Essa redução provoca uma desregulação no circuito dos gânglios da base e desencadeia o aparecimento dos sintomas motores característicos da doença: tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, distúrbios da marcha e instabilidade postural (QIAN et al, 2010; BLESA et al, 2012; KANNARKAT et al, 2013). É a segunda doença neurodegenerativa mais frequente afetando cerca de 1% da população acima de 60 anos e com o avançar da idade há o aumento da chance do seu desenvolvimento (NUSSBAUM et al., 2003; XING et al, 2007; CONNOLLY e LANG, 2014).

Outros sintomas não-motores também são observados nesses pacientes como depressão, disfunções olfatórias e transtornos do sono, podendo ser considerados como pródromos, pois podem surgir muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores e da confirmação clínica da DP (HAWKES et al, 2010; AARSLAND et al, 2012; KANNARKAT et al, 2013; SANTIAGO et al, 2014).

Nas fases iniciais da doença há uma redução de 60-65% na densidade dos terminais dopaminérgicos no putâmen, sendo que os sintomas clínicos só se manifestam após uma depleção de mais de 80% dos níveis de dopamina no estriado (GIBB e LEES, 1988; KUTER et al, 2011; OHTSUKA et al, 2013). Com base na clínica, estudos associando as características patológicas com neuroimagem sugerem que o início da degeneração ocorre 6 – 8 anos antes do surgimento dos sintomas motores (SCHAPIRA, 2009).

Um dos principais marcadores neuropatológicos da DP é a presença de corpos de Lewy (CL) nos neurônios dopaminérgicos sobreviventes da SN (GIBB e LEES, 1988; PHANI et al, 2012). Surgem como inclusões intracitoplasmáticas insolúveis, geralmente eosinofílicas, com um corpo central formado por filamentos protéicos constituídos principalmente por α -sinucleína e ubiquitina (GIBB e LEES, 1988; DUNNING et al, 2012; WELINDER et al, 2014). Acredita-se que o acúmulo dos agregados de α -sinucleína no cérebro apareça

inicialmente no bulbo olfatório e no tronco cerebral inferior, seguindo pelo tronco cerebral através da comunicação célula-célula até alcançar a SN (BRAAK et al, 2004; SCHAPIRA, 2009; DUNNING et al, 2012). A toxicidade causada pela α -sinucleína é decorrente ao acúmulo de oligômeros tóxicos formados a partir do enrolamento proteico incorreto, sendo capaz de iniciar um processo inflamatório ao estimular a ativação das células microgliais (CARTA e PISANU, 2013; SCHAPIRA et al, 2013; WELINDER et al, 2014).

A causa inicial da degeneração dopaminérgica na DP é multifatorial alguns mediadores favorecem a morte celular e conseqüentemente a progressão da neurodegeneração como a excitotoxicidade, o estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial e a neuroinflamação (BARCIA et al, 2004; DEHMER et al, 2004).

A inflamação crônica é um dos principais marcadores neuropatológicos observados nos pacientes com DP, sendo observado na SN o aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) com produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias e ativação microglial e astrogliar (GAO et al, 2002; HIRSCH et al, 2012, 2013; SANTIAGO et al, 2015; HONG et al, 2016).

Com a morte neuronal dopaminérgica há a liberação de fatores celulares apoptóticos e necróticos que são reconhecidos pelas células envolvidas com a resposta imune inata do sistema nervoso central (SNC), desencadeando um processo inflamatório através da liberação de fatores citotóxicos que provocam a morte celular (KANNARKAT et al, 2013). Isso gera o desenvolvimento de um ciclo de reativação (

FIGURA 1), estimulando o aumento da resposta inflamatória que afeta os neurônios sobreviventes e conseqüentemente favorece a progressão da degeneração.

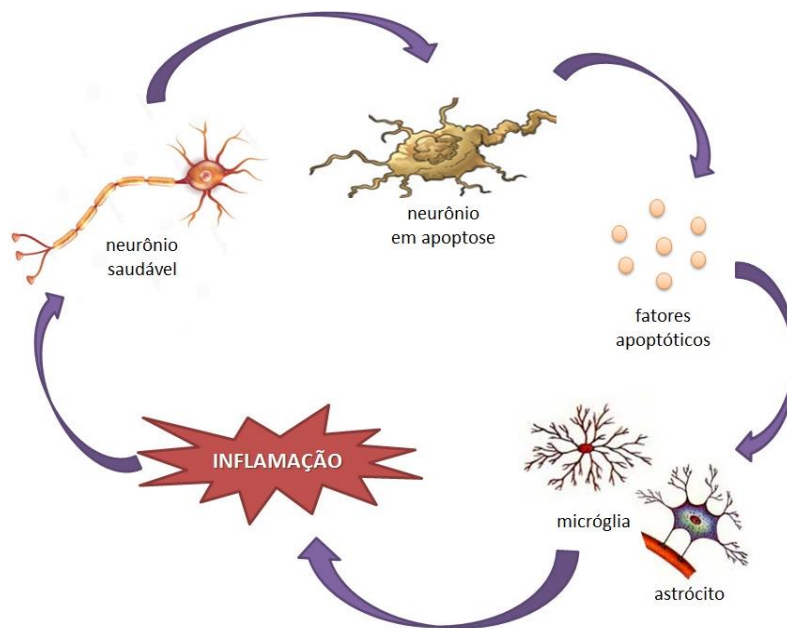


FIGURA 1 - Ciclo de reativação: O neurônio degenerado libera fatores apoptóticos e necróticos que promovem a ativação das células imunes do SNC (micróglia e astrócito) desencadeando uma resposta inflamatória. Produtos citotóxicos produzidos com a ativação dessas células amplificam o processo inflamatório causando o comprometimento das células neuronais e favorecem a degeneração celular. FONTE: O AUTOR (2016).

Evidências obtidas com estudos *post-mortem* e em modelos animais de DP demonstraram uma intensa inflamação na SN, mostrando o acúmulo de células microgliais e astrocíticas com alterações na morfologia celular e infiltrado de células T (PHANI et al, 2012). Isso sugere que a resposta imune inata associada à ativação de células gliais e a produção de mediadores pró-inflamatórios contribuem com a fisiopatologia da DP (EPISCOPO et al, 2013).

O efeito deletério sofrido pelos neurônios dopaminérgicos promovido pelo processo inflamatório é demonstrado em modelos animais de DP como o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) que produzem uma intensa reativação microglial induzindo o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias na SN e o aumento da ativação do NF- κ B (WHITTON, 2007; QIAN *et al*, 2010; ROS-BERNAL *et al*, 2011; BLANDINI, 2013; CARTA e PISANU, 2013).

1.1. NEUROINFLAMAÇÃO ASSOCIADA COM A PROGRESSÃO DA NEURODEGENERAÇÃO NA DOENÇA DE PARKINSON

Várias evidências mostram que a neuroinflamação exerce um papel central na progressão da neurodegeneração na DP levando a perda dos neurônios dopaminérgicos devido a uma resposta inflamatória crônica em curso, conduzida pelas células microgлияis e astrogлияis ativadas, com produção de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de linfócitos e macrófagos periféricos (LEVITES et al, 2002; HIRSCH et al, 2012; PISANU et al, 2014; HAIM et al, 2015).

A resposta inflamatória cerebral é mediada pelos sistemas de defesa imune inato e adaptativo, sendo as células da glia, como os astrócitos e a micrógлия responsáveis pela defesa imune inata produzindo moléculas citotóxicas para eliminar potenciais patógenos que poderiam causar algum desequilíbrio no meio neural (PHANI et al, 2012; EPISCOPO et al, 2013). Por outro lado, à ativação crônica dessas células como observado na DP produz um ciclo vicioso denominado como microglioze reativa, agredindo o neurônio e ocasionando a morte celular (CARTA e PISANU, 2013). Na SN de pacientes parkinsonianos também foram observados infiltrados de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), que são células envolvidas na defesa imune adaptativa e normalmente circulam na periferia (PHANI et al, 2012).

O envolvimento da micrógлия na degeneração neuronal foi descrita pela primeira vez por McGeer e colaboradores (1988), após observarem em pacientes parkinsonianos o aumento da imunorreatividade na SN do complexo de histocompatibilidade maior (MHC), sugerindo a associação da ativação da micrógлия e de macrófagos com a neurodegeneração dopaminérgica na DP (BARCIA et al, 2004).

O principal marcador neuroinflamatório observado na DP é a ativação das células gliais, principalmente da micrógлия que ocorre em resposta ao dano neuronal ou a mudanças imunológicas, sendo observado aumento da ativação microgлияl com acúmulo de citocinas pró-inflamatórias e radicais livres (GAO et al, 2002). Os mediadores pró-inflamatórios produzidos pela micrógлия ativam os astrócitos e promovem uma ativação da via de sinalização do NF-κB (GAO et

al, 2002; LIU et al, 2007; HIRSCH et al, 2012; BLANDINI, 2013; HONG et al, 2016). A atividade da micróglia pode ser reduzida ou até inibida através do bloqueio da atividade do NF- κ B que também está associado à fisiopatologia da DP por estar envolvido na amplificação da resposta inflamatória e indução da apoptose (ROS-BERNAL et al, 2011).

A translocação do NF- κ B para o núcleo é indicativo da sua ativação, sendo observado em pacientes parkinsonianos um aumento na proporção dos neurônios dopaminérgicos com marcação nuclear para NF- κ B (HUNOT et al, 1997).

1.1.1. ATIVAÇÃO MICROGLIAL

As células da micróglia são células imunocompetentes do SNC que realizam a defesa inata e o reparo de lesões através da liberação de fatores tróficos como *brain-derived neurotropic factor* (BDNF) e *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) que são essenciais para a sobrevivência neuronal, além de serem células sequestradoras capazes de fagocitar detritos celulares, garantindo um ambiente viável para os neurônios (GAO et al, 2002; PHANI et al, 2012).

Uma vez ativada a micróglia sofre uma rápida modificação estrutural e funcional, ocorrendo à proliferação e o recrutamento dessas células no local da lesão que exercem efeitos neuroprotetores através da liberação de neurotrofinas ou efeitos neurotóxicos pela liberação de fatores citotóxicos (HE et al, 2001). Alguns desses fatores citotóxicos são produzidos após a ativação simultânea da óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e da NADPH-oxidase, produzindo respectivamente óxido nítrico e superóxido (EPISCOPO et al, 2013). A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de mediadores inflamatórios é o que torna a ativação dessas células tão prejudiciais, uma vez que os neurônios dopaminérgicos são mais sensíveis e vulneráveis ao estresse oxidativo (QIAN et al, 2010).

A neuromelanina, um bioproduto do catabolismo dopaminérgico é um potente ativador das células microgliais, sendo detectado no cérebro de pacientes parkinsonianos pequenos fragmentos em torno dos neurônios

dopaminérgicos degenerados que são fagocitados por essas células que se tornam ativadas (HIRSCH et al, 2012). A ativação da micróglia sustentada em longo prazo amplifica o processo inflamatório já existente através da liberação de mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-1 β , eicosanoides, NO, EROs e aumento da ativação da ciclooxigenase 2 (COX-2), desencadeando uma cascata de eventos que conduzem ao aumento da neurodegeneração (GAO et al, 2002; ROS-BERNAL et al, 2011; PHANI et al, 2012).

Na presença de um estímulo patológico persistente ocorre a reativação com proliferação da micróglia que passa a produzir moléculas de adesão e fatores citotóxicos, evoluindo para o seu fenótipo fagocitário e formando um aglomerado microglial em torno do neurônio dopaminérgico degenerado que é fagocitado (CARTA e PISANU, 2013; HERRERO et al, 2015). A fagocitose causa a morte progressiva e irreversível do neurônio lesado que também libera moléculas quimioatrativas, estimulando ainda mais a proliferação microglial que passa a afetar os neurônios saudáveis sobreviventes (FIGURA 2) (WHITTON, 2007).

Pacientes com DP avançado apresentam na SN uma extensa ativação microglial que também é descrita em modelos animais da doença (HUNOT et al, 1997; MACHADO et al, 2011). He e colaboradores (2001), observaram que 3 dias após a administração estriatal de 6-OHDA houve aumento de 32% na reatividade microglial e de 55% após 7 dias com paralela degeneração de 34% dos neurônios dopaminérgicos nigrais. Primatas não-humanos receberam durante dois anos a administração diária de MPTP intravenoso e um ano após a última administração ainda era possível observar uma extensa reatividade microglial e astrogliar na SN (BARCIA et al, 2004).

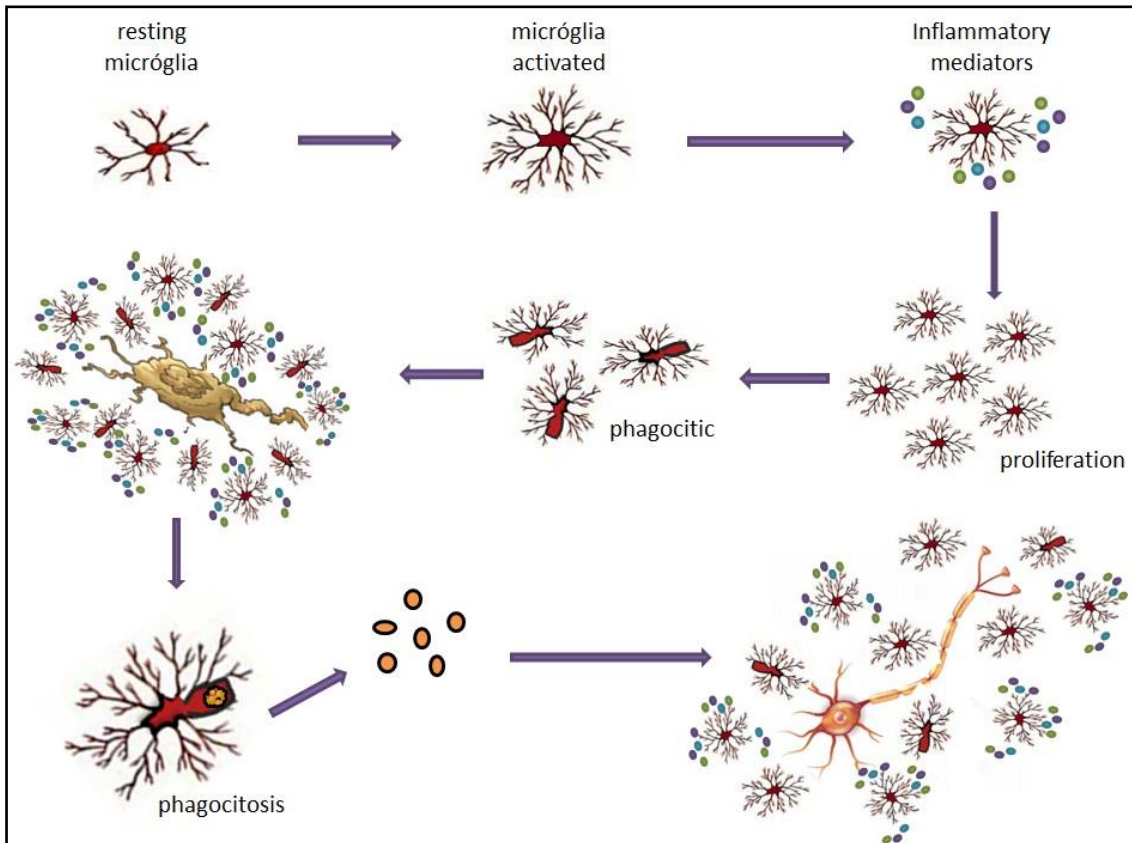


FIGURA 2 - A micróglia ativada produz moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, prostaglandina, eicosanoides e produtos do estresse oxidativo que atraem mais células da micróglia no local da lesão. A micróglia torna-se fagocitária e fagocita o neurônio degenerado que libera substâncias atrativas e estimula ainda mais a proliferação microglial no local, que passa a lesar os neurônios saudáveis sobreviventes. FONTE: O AUTOR (2016).

1.1.2. REATIVIDADE ASTROCÍTICA

Os astrócitos são células que realizam a manutenção da homeostase cerebral e regulam o metabolismo energético protegendo os neurônios contra a depleção de energia por estimular a liberação de lactato em situações de emergência (PHANI et al, 2012; EPISCOPO et al, 2013). Quando ativados produzem grandes quantidades de moléculas antioxidantes como glutathione (GSH) e superóxido dismutase (SOD), além de fatores de crescimento e neurotrofinas (GAO et al, 2002; CABEZAS et al, 2014). São responsáveis pelo reestabelecimento da barreira hemato-encefálica e pela remoção de detritos do SNC incluindo placas amiloides (PHANI et al, 2012).

A sua principal função é proteger as células contra o estresse oxidativo, sendo de extrema importância para a sobrevivência neuronal principalmente dos neurônios dopaminérgicos, uma vez que a auto-oxidação de DA produz

grandes quantidades de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que interage com íons ferro que estão presentes em grande quantidade na SN, produzindo radicais livres altamente tóxicos (EPISCOPO et al, 2013).

Os astrócitos contêm cascatas de sinalização intracelular e muitos receptores na superfície que os permite responder rapidamente a qualquer modificação do ambiente, podendo ser ativado quando existe qualquer alteração na homeostase cerebral (HAIM et al, 2015).

Em estudos *post-mortem* realizados em cérebros de pacientes parkinsonianos, assim como em modelos animais de DP são observados aumento de aproximadamente 30% na densidade de células GFAP positivas mostrando a existência de astrogliose na SN, sendo que a sua ativação prolongada é estimulada por mediadores inflamatórios produzidos pela micróglia e pelos neurônios lesados (EPISCOPO et al, 2013).

1.1.3. FATOR NUCLEAR POTENCIADOR DA CADEIA LEVE KAPPA DE CÉLULAS B ATIVADAS (NF- κ B)

O NF- κ B é um fator de transcrição que regula a expressão gênica de imunoglobulinas em linfócitos B e embora esteja principalmente relacionado à transcrição de genes envolvidos no processo inflamatório também participa da regulação de funções neurais como plasticidade, desenvolvimento neural, sinalização sináptica e sobrevivência celular (BLANCO e NETO, 2003; FRANCO, 2010). Em situações neuropatológicas é ativado por citocinas, quimiocinas, lipopolissacarídeos, vírus (HIV), fatores de crescimento e fatores indutores de estresse (BLANCO e NETO, 2003; MÉMET, 2006).

Consiste em cinco subunidades: p65 (ou RelA), cRel, RelB, p50 e p52, que podem atuar formando dímeros ativadores (p65-p50) ou dímeros repressores (p50-p50 e p52-p52) (TROIB e AZAB, 2015). A atividade do NF- κ B é rigorosamente regulada pela interação com proteínas inibitórias que apresentam afinidade diferente e são conhecidas como I κ B (I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B-R, I κ B γ , Bcl-3) (GILMORE, 2006).

O NF- κ B é ativado pela via clássica e quando em repouso permanece no citoplasma acoplado à I κ B, sendo necessária a fosforilação dessa proteína inibitória com liberação do dímero ativado que é translocado para o núcleo

onde liga-se a região promotora do gene κB (LIU et al, 2007; FRANCO, 2010; LEE et al, 2014). Na presença de um sinal ocorre a ativação da I κ B - quinase (IKK) que fosforila a I κ B que posteriormente é degradada pelo proteossoma em resíduos de serina (YIN et al, 2001; FRANCO, 2010). A fosforilação da I κ B causa a dissociação do NF- κ B que é liberado e transportado para o núcleo, ligando-se ao DNA e iniciando a transcrição de genes envolvidos na resposta imune e ao estresse, na proliferação e diferenciação celular e na apoptose (YIN et al, 2001; BLANCO e NETO, 2003; LIU et al, 2007; NOLAN et al, 2013; LEE et al, 2014; TROIB e AZAB, 2015).

Em ratos saudáveis níveis mais altos do NF- κ B são encontrados em estruturas cerebrais como a SN, hipocampo, estriado, córtex cerebral e em células da glia comparado a outras estruturas, existindo uma expressão constitutiva desse fator de transcrição que é mantida por diferentes neurotransmissores como glutamato, dopamina, noradrenalina e neurotrofinas (MÉMET, 2006; FRANCO, 2010).

A ativação do NF- κ B está relacionada à regulação da expressão de citocinas inflamatórias, sendo que baixos níveis de citocinas estimulam a produção e liberação de fatores neurotróficos para a manutenção do meio neural (PHANI et al, 2012; THAKUR e NEHRU, 2013). Níveis elevados de citocinas como os observados na DP ativam vias inflamatórias com produção de substâncias que podem ativar vias apoptóticas e induzir a morte celular (THAKUR e NEHRU, 2013). Com isso, as citocinas pró-inflamatórias liberadas pela micróglia na DP podem se ligar diretamente aos receptores de citocinas presentes na superfície dos neurônios dopaminérgicos e desencadear a ativação do NF- κ B induzindo a apoptose (PHANI et al, 2012).

A expressão aumentada do NF- κ B em neurônios dopaminérgicos foi observada na SNpc de pacientes parkinsonianos (PHANI et al, 2012; HAIM et al, 2015). Aumento dos seus níveis nigroestriatais bem como a sua ativação persistente também foram encontrados em modelos animais de DP (PRANSKI et al, 2013).

1.2. RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMAS (PPAR)

Os PPARs são uma superfamília de receptores nucleares que atuam como fatores de transcrição dependentes de ligantes que apresentam três isoformas conhecidas: o PPAR- α , PPAR- β/δ e PPAR- γ , que estão distribuídos em diferentes tecidos e realizam diferentes funções biológicas (CARTA e PISANU, 2013). São receptores envolvidos na expressão e controle de genes envolvidos no equilíbrio energético e na homeostase da glicose e lipídios que são amplamente ativados em situações como uma dieta rica em gordura ou em condições de aclimatação ao frio (KLIEWER *et al*, 1994; DE FILIPPIS *et al*, 2015). Quando ativados esses receptores provocam o aumento do tamanho e do número de peroxissomas hepáticos e renais, aumentando a capacidade de metabolização dos ácidos graxos através do aumento da expressão das enzimas necessárias para o ciclo oxidativo (KLIEWER *et al*, 1994).

O PPAR- α é expresso principalmente no tecido adiposo marrom e no fígado, realizando o controle da expressão de genes relacionados ao metabolismo lipídico e à montagem e transporte de lipoproteínas (KERSTEN *et al*, 2014). O PPAR- β/δ está distribuído em grande quantidade no cérebro e na pele, entretanto a sua função ainda não está estabelecida, mas acredita-se que esteja relacionado com o metabolismo lipídico realizando a oxidação ácidos graxos (GOMES, 2006; DE FILIPPIS *et al*, 2015).

1.2.1. PPAR – γ

O PPAR- γ está envolvido com a regulação da homeostase da glicose, na diferenciação de adipócitos e no metabolismo lipídico estimulando o armazenamento de ácidos graxos (DEHMER *et al*, 2004; KROKER e BRUNING, 2015; SAUER, 2015). Duas isoformas são expressas tanto em humanos como em animais, sendo o PPAR- γ 2 expresso exclusivamente no tecido adiposo, enquanto que o PPAR- γ 1 é encontrado em vários tipos celulares além do tecido adiposo como cérebro, coração, fígado, baço, pâncreas, retina, músculo liso e esquelético e em células imunes como monócitos, macrófagos, células T e células dendríticas onde está envolvido

com a expressão de genes inflamatórios (RIGAMONTI et al, 2008; CARTA e PISANU, 2013; ZHANG et al, 2015).

Alguns estudos sugerem que o PPAR- γ está envolvido com o desenvolvimento neuronal, pois em cérebro de ratos adultos são encontrados níveis muito baixos desse receptor, enquanto que em embriões de ratos e em células-tronco neuronais são observados uma expressão altíssima do PPAR- γ (QUINTANILLA et al, 2014).

Com a ligação de agonistas específicos ao PPAR- γ ocorre à ativação desse receptor que atua formando heterodímeros com o receptor de ácido retinóico (RXR) (RIGAMONTI et al, 2008). O heterodímero formado liga-se a uma sequência específica do DNA conhecida como elementos de resposta ao PPAR (PPRE), combinando-se a proteínas coativadoras e iniciando a transcrição gênica, podendo ativar ou reprimir genes dependendo do contexto molecular (QUINTANILLA et al, 2014; KROKER e BRUNING, 2015; SAUER, 2015). São ativados por ácidos graxos insaturados, eicosanoides, prostaglandinas e por ligantes sintéticos como o ibuprofeno e principalmente pelas tiazolidinedionas (DEHMER et al, 2004; ZHANG et al, 2015).

1.2.2. AGONISTAS SINTÉTICOS DO PPAR – γ EM MODELOS DA DP

Agonistas sintéticos para os receptores PPAR- γ foram desenvolvidos para serem utilizados no tratamento do diabetes tipo 2, uma vez que a ativação desse receptor promove o aumento a sensibilização à insulina (SADAGHIANI et al, 2011; SAOIRSE et al, 2016). Essas drogas como a pioglitazona são utilizadas no tratamento de algumas hiperlipidemias e pertencem à classe das tiazolidinedionas que são capazes de reduzir a resistência à insulina e equilibrar os níveis de glicose e de ácidos graxos sanguíneos (DEHMER *et al*, 2004; QUINTANILLA *et al*, 2014). Na sua estrutura química há um anel diona que ativa o seu mecanismo de ação na presença de insulina, diminuindo a resistência à insulina no fígado e periferia (GOMES, 2006).

Efeitos relacionados com a atividade anti-inflamatória e neuroprotetora da pioglitazona são descritos em modelos animais de DP protegendo os neurônios dopaminérgicos da SN contra a morte neuronal (QUINN et al, 2008).

Com a ativação do PPAR- γ também é observado a inibição de genes envolvidos na resposta inflamatória atenuando a ativação glial, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e a ativação da COX-2 (BREIDERT et al, 2002; DEHMER et al, 2004; SADAGHIANI et al, 2011; BARBIERO et al, 2014).

Quando ativada a micróglia pode adquirir dois fenótipos, sendo um fenótipo anti-inflamatório produzindo citocinas anti-inflamatórias na tentativa de reduzir o dano existente e outro pró-inflamatório favorecendo a inflamação através da produção de citocinas pró-inflamatórias que estimulam a via do NF- κ B e que na presença de uma lesão progressiva se sobrepõe ao fenótipo anti-inflamatório (LEONARD e MAES, 2012; CARTA e PISANU, 2013). Por isso, acredita-se que a pioglitazona reduza a ativação microglial e a produção de citocinas pró-inflamatórias por inibir a ativação do NF- κ B, com uma possível estimulação na produção de citocinas anti-inflamatórias (CARTA e PISANU, 2013).

Algumas hipóteses foram sugeridas na tentativa de explicar o efeito inibitório da pioglitazona sobre a ativação do NF- κ B (DEHMER et al, 2004; SAUER, 2015). Uma dessas hipóteses foi sugerida por Dehmer e colaboradores (2004), depois de observar que o tratamento com pioglitazona aumentou a expressão da I κ B na SN após a administração de MPTP em camundongos. Assim, acredita-se que a indução da expressão da I κ B pela ativação do PPAR- γ (FIGURA 3. A) seja capaz de reduzir a ativação do NF- κ B nuclear (RIDDER e SCHWANINGER, 2012). Outros mecanismos sugeridos que poderiam ser associados com a inibição da ativação do NF- κ B envolve a interação direta com o PPAR- γ , que seria capaz de translocar o dímero p65/p50 do núcleo para o citoplasma ou ainda induzir a degradação do NF- κ B (FIGURA 3. B) (SAUER, 2015). Por outro lado, o PPAR- γ poderia afetar diretamente o mecanismo de ação do NF- κ B competindo pelos mesmos coativadores necessários para a iniciação da transcrição (FIGURA 3. C) ou o PPAR- γ poderia se ligar a região do gene onde o NF- κ B se ligaria e desta forma impediria a transcrição (FIGURA 3. D) (YIN et al, 2001; SAUER, 2015).

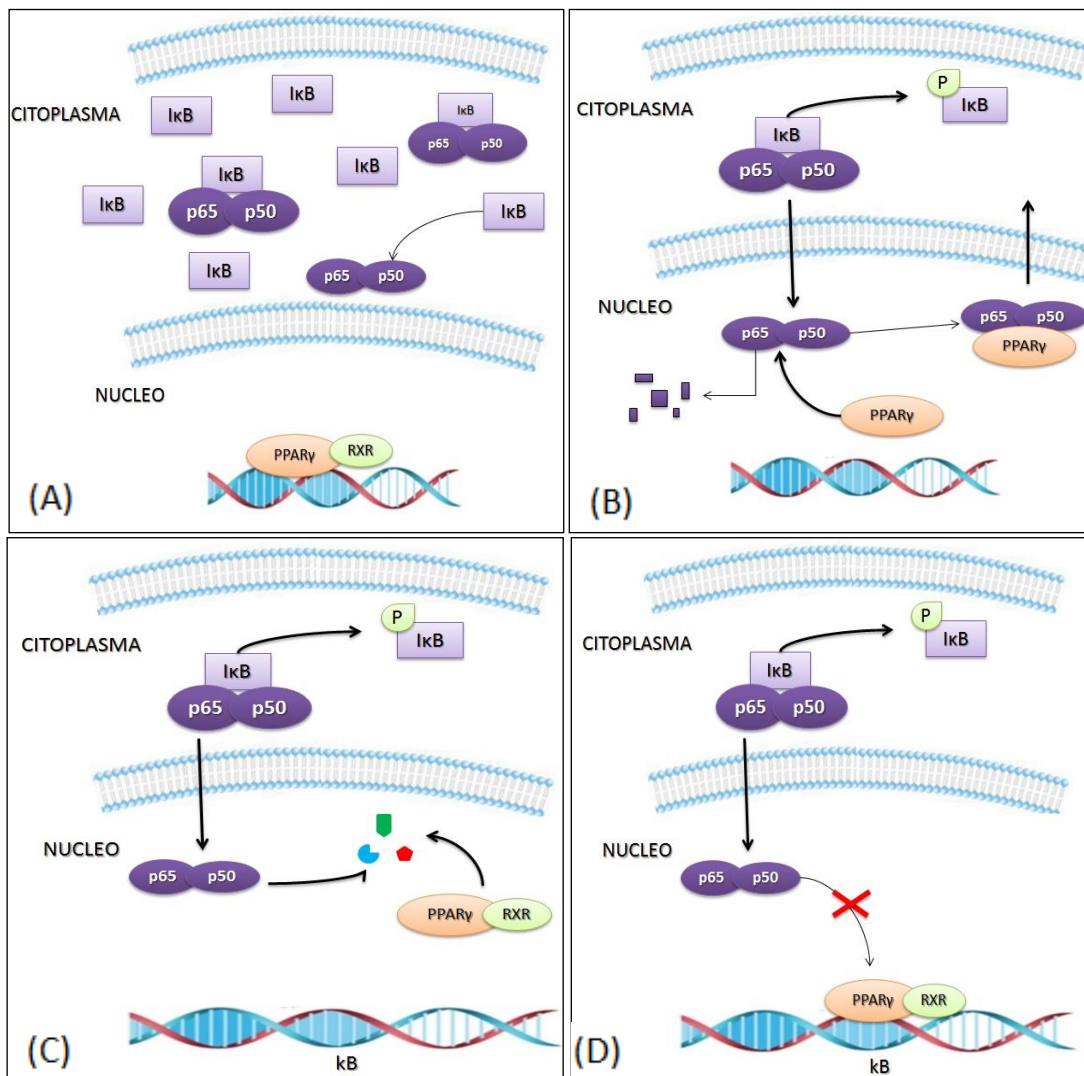


FIGURA 3 - Mecanismos sugeridos para explicar a interação entre o PPAR- γ e o NF- κ B. (A) O PPAR- γ estimularia a produção da I κ B que se acoplaria ao NF- κ B ou confinando no citoplasma impedindo sua ativação. (B) Ocorreria uma interação física direta. O PPAR- γ seria capaz de exportar o NF- κ B do núcleo para o citoplasma ou estimular a sua degradação. (C) Haveria uma competição entre o PPAR- γ e o NF- κ B pelos mesmos co-ativadores impedindo a iniciação da transcrição. (D) O PPAR- γ poderia se ligar ao sítio do gene onde o NF- κ B se ligaria. FONTE: O AUTOR (2016).

Considerando as evidências da literatura, o presente estudo investigou os efeitos da pioglitazona no modelo animal da 6-OHDA de DP. Para isso nós realizamos um tratamento subcrônico com pioglitazona, iniciado 24 hr após a infusão intranigral da toxina e observar os seus possíveis efeitos neuroprotetores após a lesão neuronal já instalada.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito da pioglitazona no modelo animal de DP induzido pela 6-OHDA em ratos, frente aos principais marcadores neuropatológicos inflamatórios observados na SN.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da pioglitazona sobre a atividade motora dos animais lesados com a 6-OHDA através do teste do campo aberto;
- Estudar o efeito neuroprotetor da pioglitazona após a lesão com 6-OHDA através da quantificação de neurônios imunorreativos à TH (TH-ir) na SNpc;
- Verificar o efeito da pioglitazona sobre a ativação das células microgliais através da quantificação da marcação s pelo Iba-1 na SNpc;
- Observar o efeito da pioglitazona sobre a expressão e ativação do NF- κ B na SNpc.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, resultados e discussão do estão descritos no artigo científico a seguir.

Neuroprotective effect of pioglitazone, a PPAR- γ agonist in 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease

Meira Maria Forcelini Machado¹, Taysa Bervian Bassani¹, Valentín Cópola-Segovia², Paula Kempe¹, Eric Luiz Rossa Moura¹, Silvio Zanatta², Roberto Andreatini¹, Maria Aparecida Barbato Frazão Vital¹

¹Department of Pharmacology, Federal University of Paraná, Curitiba PR, Brazil.

²Department of Basic Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba PR, Brazil.

Corresponding author:

Maria Aparecida Barbato Frazão Vital
Department of Pharmacology
Federal University of Paraná
Phone: +55 41 3361 1717
Fax: +55 41 3266-2042
Email: vital@ufpr.br

Abstract

Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ) have been receiving greater attention due to its neuroprotective and anti-inflammatory effects that produce a reduction of cell death preventing an advance of neurodegeneration. In this study we evaluated the effects of the treatment during 5 days with pioglitazone (30 mg/kg) in male Wistar rats that received intranigral bilateral infusion of 6-hydroxydopamine (6-OHDA). After the surgery rats were evaluated in the open-field test on days 1,7,14 and 21. Immediately after the behavioral tests rats were euthanized with removal of the substantia nigra (SN) for the analysis of the NF- κ B and I κ B expression by western blot. Through immunohistochemistry of the SN were observed the TH immunoreactivity (TH-ir), the microglia activation (Iba-1) and NF- κ B translocation to the nucleus. Pioglitazone was able to protect against the hypolocomotion and the dopaminergic neurodegeneration caused by 6-OHDA on day 7. There was also a reduction of microglia activation, and mainly a reduction of NF- κ B expression with inhibition of the p65 activation in the nucleus. Thus, pioglitazone may be considered a potential adjuvant in PD therapy due to its effects on the pathological markers associated with the neurodegenerative progression.

Keywords: Parkinson's disease, pioglitazone, PPAR- γ , NF- κ B, neuroinflammation.

1. Introduction

Parkinson's disease (PD) is a slow progressive neurodegenerative disease that affects approximately 1% of population over 60 years increasing the chance of developing with the advancing age (Connolly and Lang, 2014; Schapira, 2009). The PD is characterized by degeneration of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compact (SNpc) promoting a loss of their nerve terminals in the basal ganglia (Dauer and Przedborski, 2003; Kalia et al., 2015; Salat et al., 2016). The clinical manifestation of PD characterized by motor symptoms such resting tremor, rigidity and bradykinesia appear after a loss 70-80% of dopaminergic neurons from SNc (Hawkes et al., 2010; Kuter et al., 2011). Besides to this symptoms some non-motor manifestations are also observed in these patients such depression, sleep and olfactory disorders which may arise many years before of the motor symptoms (Hawkes et al., 2010; Kuter et al., 2011; Magnard et al., 2016; Santiago et al., 2010).

The chronic inflammation is one of the main neuropathological markers of PD being observed an increase of the cyclooxygenase 2 expression (COX-2), the production of pro-inflammatory cytokines, besides the microglial and astrocytic activation in the substantia nigra (SN) favoring the progression of the neurodegeneration (Gao et al., 2002; Hirsch et al., 2012, 2013; Hong et al., 2016; Santiago et al., 2015).

When there is any sign of damage the microglia cells suffer a quick change increasing the expression of molecules on their surface, releasing pro-inflammatory mediators that can activate the astrocytes and stimulates the up-regulation of the signaling pathways NF- κ B contributing even more to the inflammatory process (Blandini, 2013; Gao et al., 2002; Liu et al., 2007; Hirsch et al., 2012; Zhang et al., 2016). In a post-mortem study Hunot et al., (1997) observed that in brains of parkinsonian patients there is a considerable increase in the expression of NF- κ B. The nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) is a complex of proteins that act as transcription factors involved in the immune and stress response, cell proliferation, differentiation and apoptosis (Lee et al., 2014; Liu et al., 2007; Nolan et al., 2013). The NF- κ B activation occurs after the phosphorylation of the I κ B with the

release of p65/p50 dimer, which is translocated to the nucleus transcribing genes involved in the inflammatory response (Lee et al., 2014; Liu et al., 2007; Luengo Blanco and Neto, 2003; Yin et al., 2001).

The receptors activated by peroxisome proliferators (PPARs) are a superfamily of nuclear receptors that are known as transcription factors dependents of linkers involved in the regulation of energetic metabolism, homeostasis, cell differentiation and inflammation (De Filippis et al., 2015; Liu et al., 2016; Saoirse et al., 2016). The most studied subtype is the PPAR- γ and when activated it promotes the increase of the sensitization to insulin and modulates the metabolism of glucose and lipids (Saoirse et al., 2016). Pioglitazone is a PPAR- γ agonist used in the treatment of diabetes type II that present an anti-inflammatory effect reducing the cytokines production and the oxidative stress in models of neurodegenerative diseases (Dehmer et al., 2004; Liu et al., 2016; Sadaghiani et al., 2011).

Previous studies showed that the treatment with pioglitazone in MPTP model was able to protect against the depletion of dopamine in the striatum and reduced the caspase-3 activation which is involved in the apoptosis (Barbiero et al., 2014). Considering that the exposure to 6-hydroxydopamine (6-OHDA) model mimic the extensive inflammatory process in the SN which is also seen in parkinsonian patients, we decided evaluated the potential neuroprotective effect of pioglitazone on motor activity as well as on microglia and NF- κ B activation in rats after exposure to 6-OHDA.

2. Experimental procedures

2.1. Animals

Male Wistar rats weighing 280-320g at the beginning of the experiments were used. The animals were randomly housed in groups of five in polypropylene cages with wood shavings and maintained in a temperature-controlled room ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) with a 12h/12 h light/dark cycle. The animals had free access to water and food.

All of the experiments were performed in accordance with the guidelines of the Committee on the Care and Use of Laboratory Animals, United States

National Institutes of Health. The experimental protocol complied with the recommendations of the Federal University of Paraná and was approved by the Institutional Ethics Committee (protocol nº. 881).

2.2. *Drugs*

- 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) – 6 µg in 1 µl of CSF, supplemented with 0,2% ascorbic acid; Sigma, St. Louis, MO, USA;
- Pioglitazone – ActosTM from Abbott, IL, USA – 30 mg/kg, oral gavage;
- Drug vehicle – Carboxymethylcellulose 1% (CMC) dissolved in distilled water;
- Anesthetic – Equitesin – 0.3 mg/kg, intraperitoneal;
- Atropine sulfate – 0.4 mg/kg, intraperitoneal;
- Sodium bicarbonate – 0.8 mg/kg, intraperitoneal;
- Antibiotic – Penicillin G-procaine – 20,000 U in 0.1ml, intramuscular.

2.3. *Experimental design*

The rats were randomly distributed into two groups: 6-OHDA and sham groups that were submitted to a bilateral intranigral infusion through stereotaxic surgery. These groups were subdivided into other groups: sham + vehicle ($n=8-10$ /experiment), sham + pioglitazone ($n=8-10$ /experiment), 6-OHDA + vehicle ($n= 8-10$ /experiment) and 6-OHDA + pioglitazone ($n=8-10$ /experiment). Pioglitazone was administered at dose 30 mg/kg in vehicle (veh) suspension contained CMC 1% and administered by oral gavage once a day for 5 days after surgery always in the morning. The treatment protocol was conducted based in previous studies (Barbiero et al., 2011).

One, 7, 14 and 21 days after surgery the animals were subjected to tests that evaluate the motor function and at day 21 they were anaesthetized and were submitted to intracardially perfused for histological assessment or decapitated for removal of the SN.

2.4. *Stereotaxic surgery*

The rats were anesthetized with equitiesin and received atropine sulfate before the surgery. After the surgery sodium bicarbonate and penicillin G-procaine were administered. Bilateral infusions were performed through a 27-gauge stainless steel needle according to the following coordinates: anteroposterior (AP) -5.0 mm from bregma; medio-lateral (ML: ± 2.1 mm from the midline; dorso-ventral (DV) -8.0mm from skull (Paxinos). The flow of each injection was controlled with an electronic pump (Harvard Apparatus, USA) at a rate of 0.33 μ l/min until complete 1 μ l each site. The needle remained by 2 min in the injection site after the infusion to avoid reflux.

2.5. *Open-field test*

The apparatus consists of a circular arena (97 cm diameter, 42 cm height) with the white floor and divided into 19 quadrants, localized in a room with control of luminosity that was maintained at 40 lux during the experiment. The animals were placed in the center of the arena and for 5 minutes freely explore the entire arena and two motor parameters were evaluated: locomotion frequency and rearing frequency. The open field was washed with a 5% water-ethanol solution before behavioral testing to eliminate possible bias caused by odors left by previous rats.

2.6. *Western blot analysis*

Rats were decapitated 21 days after surgery and the brains were rapidly dissected on ice with removal of the substantia nigra (SN) that was stored at -80°C until processed for analysis. Samples were manually homogenized in lysis buffer containing 50mM NaCl, 50mM HEPES, 2mM EDTA, 1% Triton X-100, 1mM PMSF, 1mM sodium orthovanadate and complete protease inhibitor mixture EDTA-free (Roche). Following lysis, samples were centrifuged 10 minutes at 12,000xg at 4°C, and supernatant collected. Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad, Germany). Samples were

subjected to electrophoresis on a 12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (GE Healthcare). Membranes were then blocked in 5% skim milk in TBS-T (20mM Tris-HCl, pH 7.6, 137mM NaCl and 0,1% Tween20), for 1h at room temperature and incubated overnight with the desired primary antibody diluted in blocking solution at 4°C. Antibodies employed were: mouse monoclonal anti- β -actin (A5441, Sigma), rabbit polyclonal anti-NF- κ B p65 (sc-372, Santa Cruz, 1:500) and rabbit polyclonal anti-I κ B α (sc-371, Santa Cruz, 1:500). After primary antibody incubation, membranes were washed three-times with TBS-T and incubated with HRP-conjugated secondary antibody (Sigma) in blocking solution for 1h at room temperature. Finally, membranes were extensively washed in TBS-T and immune complexes were detected using the ECL chemiluminescent detection system (GE Healthcare Life Sciences, Brazil). Protein levels were quantified by densitometry using ImageJ v1.47 software (National Institutes of Health, USA).

2.7. *Immunohistochemistry*

Rats were deeply anesthetized using ketamine (100 mg/kg) and xylazine (20 mg/kg) intraperitoneal immediately after the behavioral test at 21 day and intracardially perfused with PBS, followed by 4% paraformaldehyde (paraformaldehyde in 0.1M PBS, pH 7.4). The brains were removed and immersed in the fixative solution 4% paraformaldehyde for 24h at 4°C. Then, the brains were immersed in 30% sucrose solution for 3 days at 4°C and passed this time they were frozen on dry ice and stored at -80°C until cryostat sectioning. Brains were sliced into 40 μ m coronal sections (-4.92 to -5.28 from bregma) and stored in anti-freezing solution (30% ethyleneglycol, 30% sucrose in PBS) at -20°C. The tissues were washed with buffer A (BA - 0,3% Triton in PBS) and placed in citrate buffer for 30 min for antigen retrieval. Posteriorly, the tissues were placed in hydrogen peroxide solution (hydrogen peroxide 3% + PBS) for 30 min and after in block buffer (BA + 5% BSA) for 1h. The primary antibody was incubated overnight at 4°C with stirring. The antibodies used were polyclonal goat anti-Iba-1 IgG (ab5076, Abcam, 1:500) or polyclonal rabbit anti-NF- κ B p65 (sc-372, Santa Cruz, 1:500). The slices were washed again and

then incubated with the biotinylated secondary antibody goat anti-goat IgG (BA-9500, Vector, 1:300) and fluorescent secondary antibody anti-rabbit IgG (Alexa Fluor® 488 – A-11008, 1:500) in block buffer at 4°C with stirring for 2h. After the incubation with the fluorescent antibody the tissues were directly mounted onto slides covered with glycerol 50%+ DAPI and cover slip. To the biotinylated antibody the slices were washed with BA and incubated for 2h with ABC system kit (PK6101, Vectastain ABC Elite kit, Vector Laboratories), followed by reaction with 3,3'-diaminobenzidine without nickel. The slices were mounted onto slides and dehydrated in ethanol solutions from 20% to 100 % and immersed twice in xylene and covered with cover slip and Entellan New (Merk).

For the tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-ir) a similar procedure was performed but without the antigen retrieval and PBS was used instead of buffer A. The primary antibody mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase IgG (TH - #MAB318, Millipore, 1:2000) and the secondary antibody biotinylated goat anti-mouse IgG (BA9200, Vector, 1:500) were used.

The slices were scanned with a digital camera connected to a microscope (Olympus Optical Japan). The number of TH-ir was quantified by densitometry using ImageJ v1.47 software (National Institutes of Health, USA). The reactive cells to Iba-1 were counted visually with Image-Pro Express 6 software (Media Cybernetics, USA). The nucleus p65+ was quantified visually with the NIS-Elements Viewer 4.2 (Nikon Instruments Inc., USA).

2.8. *Statistical analysis*

The data from the open-field test were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures followed by the Bonferroni *post hoc* test. The immunohistochemistry was analyzed using one-way ANOVA followed by the Tukey's test. Western blot data was analyzed using unpaired *t*-test for each group. The results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) and the level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Behavioral effects of pioglitazone in 6-OHDA lesioned rats

In the open-field test the 6-OHDA groups showed a decrease in locomotion frequency ($p < 0.001$) compared with the sham + veh 1 day after surgery (Table 1). The 6-OHDA + veh group 7 days after surgery remained with a decrease in locomotion frequency ($p < 0.05$) compared with the sham + veh while the 6-OHDA + pioglitazone group did not show difference ($p > 0.05$) compared with the same group, but presented a significant increase in locomotion frequency ($p < 0.001$) compared with the 6-OHDA + veh group. There was no difference between the 6-OHDA + veh group and the sham + veh group on days 14 and 21 ($p < 0.05$) in locomotion frequency after surgery. There was a significant increase in locomotion frequency in the 6-OHDA + pioglitazone group on days 14 ($p < 0.05$) and 21 ($p < 0.001$) compared with the 6-OHDA + veh group. Significant effects of treatment ($F_{3,27} = 5.253$, $p = 0.0055$), days ($F_{3,81} = 51.10$, $p < 0.0001$) and treatment x days interaction ($F_{9,81} = 6.682$, $p < 0.0001$) for locomotion frequency was observed.

The 6-OHDA + veh group showed a decrease rearing frequency ($p < 0.001$) compared with the sham + veh only on day 1 after surgery. There was no difference between the groups in the rearing frequency on days 7, 14 and 21 ($p > 0.05$) but is observed significant effects of treatment ($F_{3,27} = 2.959$, $p = 0.0501$), days ($F_{3,81} = 14.81$, $p < 0.0001$) and treatment x days interaction ($F_{9,81} = 2.2290$, $p < 0.0241$).

Table 1. Effects of pioglitazone on open-field test in rats after intranigral infusion of 6-OHDA.

Group	Time-point (day)	Locomotion Frequency	Rearing Frequency
Sham + veh	1	79.70 ± 6.484	18.30 ± 1.850
	7	110.00 ± 10.195	22.20 ± 2.699
	14	114.10 ± 12.109	22.10 ± 2.100
	21	109.20 ± 10.226	19.00 ± 2.793
Sham + Pioglitazone	1	92.25 ± 7.732	16.25 ± 2.631
	7	115.75 ± 12.958	23.37 ± 4.964
	14	106.62 ± 18.130	18.75 ± 3.261
	21	120.75 ± 12.678	27.00 ± 3.54
6-OHDA + veh	1	18.16 ± 6.343**	2.40 ± 0.945**
	7	64.33 ± 10.484*	11.90 ± 2.706
	14	80.33 ± 10.327	13.83 ± 2.358
	21	83.00 ± 16.342	16.83 ± 4.458
6-OHDA + Pioglitazone	1	28.85 ± 8.489**	8.12 ± 2.295
	7	133.71 ± 11.322###	24.25 ± 4.682
	14	127.57 ± 4.064#	17.62 ± 3.635
	21	145.14 ± 9.765###	26.37 ± 3.035

Rats after 6-OHDA infusion had hypolocomotion 1 day after the surgery. After 7 days the hypolocomotion was still observed in the 6-OHDA+veh compared with the Sham+veh, while 6-OHDA+pioglitazone recovered the motor activity. The data are expressed as mean ± SEM ($n = 8-10/\text{group}$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared with sham+veh group, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, #### $p < 0.0001$ compared with 6-OHDA+veh group (two-way ANOVA followed by Bonferroni test).

3.2. Effects of pioglitazone on Tyrosine Hydroxylase immunoreactivity (TH-ir)

The neuroprotective effect of the pioglitazone on the dopaminergic neurons was examined by tyrosine hydroxylase immunoreactivity (TH-ir) by immunohistochemistry (Figure 1). The administration of the intranigral 6-OHDA (Figure 1b) caused a loss of 42% of the TH-ir neurons in the SNc compared with the sham group ($p < 0.0001$). The 6-OHDA+pioglitazone group did not show difference from the sham+veh group, and it was observed a significant difference of 37% compared with the 6-OHDA+veh group ($p < 0.0001$), indicating that pioglitazone treatment was able of protect against the neuronal death. Significant effect was observed between the treatments ($F_{3,83} = 12.86$; $p < 0.0001$).

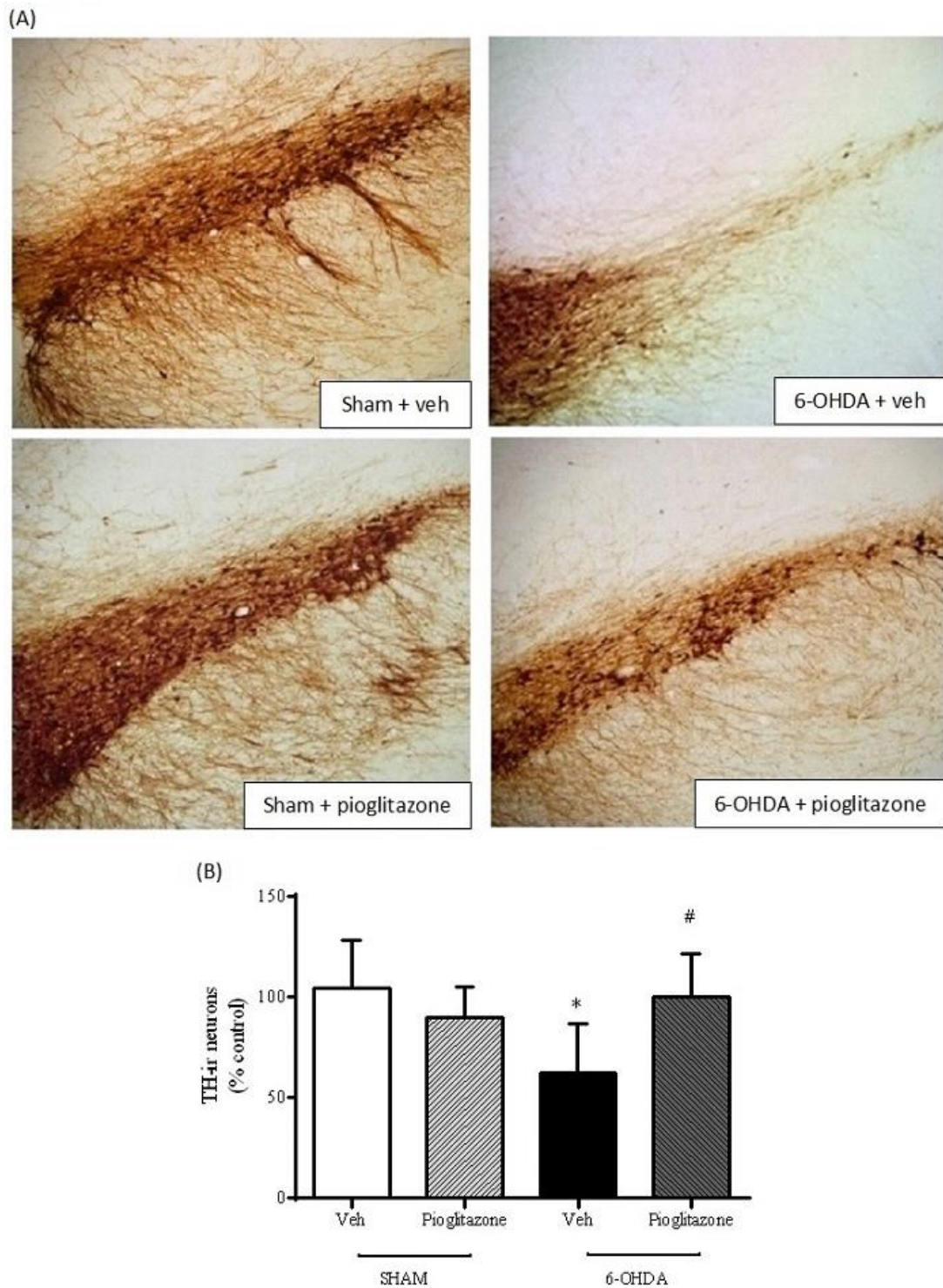


Figure 1. Immunohistochemistry analysis of the SNc in rats 21 days after the surgery. (A) Photomicrograph of representative sections of TH-ir neurons (100x magnification). (B) Quantification of the TH-ir neurons. 6-OHDA + veh group showed reduction of 42% in the TH-ir neurons compared with the Sham+veh. 6-OHDA + pioglitazone group was not different from the Sham+veh. The difference between the 6-OHDA groups was of 37%. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$ /group). **** $p < 0.0001$ compared with sham+veh group, # $p < 0.0001$ compared with 6-OHDA+veh group (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

3.3. Microglia activation after treatment with pioglitazone

The microglia is the main cell type involved in the inflammatory response in the CNS. Both the 6-OHDA groups presented an increase in the total number of microglia cells compared with the sham+veh group (

Figure 2). The 6-OHDA+veh group showed an increase of 79% in the total number ($p < 0.0001$) while the 6-OHDA+pioglitazone group presented a slight increase of 29% ($p = 0.001$,

Figure 2b). The 6-OHDA group treated with pioglitazone presented a lesser increase with a difference of 50% in the total number of microglia compared with the 6-OHDA group treated with the vehicle ($p < 0.0001$). The sham+pioglitazone group showed a decrease of 41% of the total number of microglia ($p < 0.0001$) compared with the sham+veh. Significant difference was observed in the treatment ($F_{3,225} = 80.79$, $p < 0.0001$).

The number of the activated microglia cells (Figure 2c) in the 6-OHDA+veh group had an increase of 50% compared with the sham+veh group ($p < 0.001$). In the 6-OHDA+pioglitazone group no difference was observed ($p > 0.05$) from sham+veh, however had a difference of 50% from 6-OHDA+veh. Significant difference was observed between the treatments ($F_{3,214} = 9.412$, $p < 0.0001$).

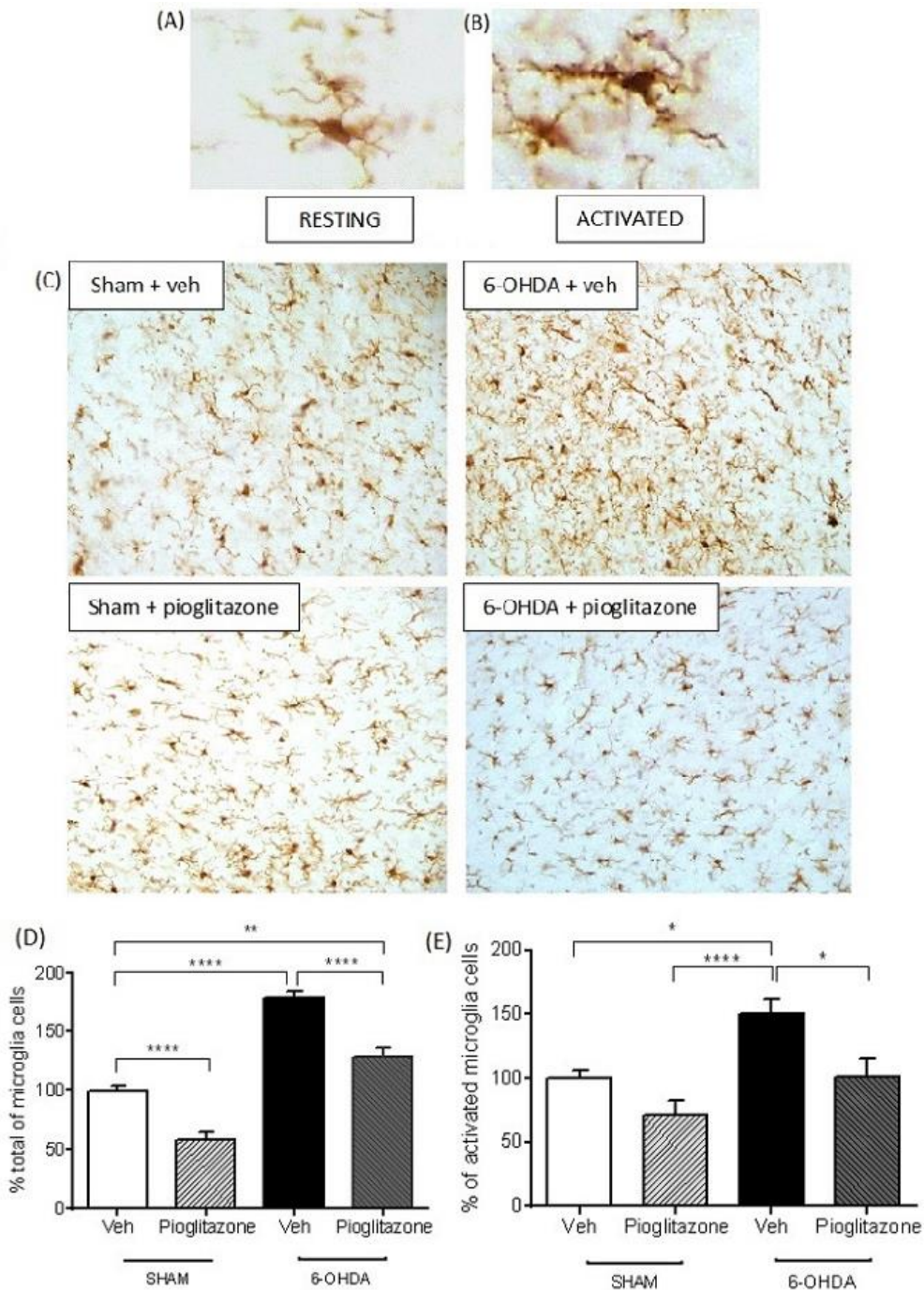


Figure 2. Immunohistochemistry analysis to IBA-1 performed in the SNc in rats 21 days after the surgery. (A) Photomicrograph of resting microglia and (B) microglia activated. (C) Photomicrograph of microglia cells with Iba-1 in the groups (200x magnification). (D) Percentages (%) total of microglia cells. 6-OHDA+veh group had increase of 79% microglia cells compared with Sham+veh group, however 6-OHDA+pioglitazone had increase of only 29%. (E) % of activated cells microglia. The activated microglia cells was increased in 6-OHDA+veh group shown difference of 50% from Sham+veh group, while 6-OHDA+pioglitazone group did not showed difference from the same group. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 4$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ compared with sham+CMC group, # $p < 0.05$, ##### $p < 0.0001$ compared with 6-OHDA+veh group (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

3.4. Pioglitazone effect on NF- κ B and I κ B expression

p65 expression of the NF- κ B in the SN (Figure 3b) was increased in the 6-OHDA+veh group compared with the sham+veh group ($p < 0.001$). The 6-OHDA+pioglitazone group did not show difference from the sham group, and it was not observed a significant reduction of NF- κ B expression compared with the 6-OHDA+veh group ($p = 0.0595$). The I κ B inhibitory protein expression in SN (Figure 3c) was increased in the 6-OHDA+pioglitazone groups compared with the sham+veh and sham+pioglitazone groups ($p < 0.05$).

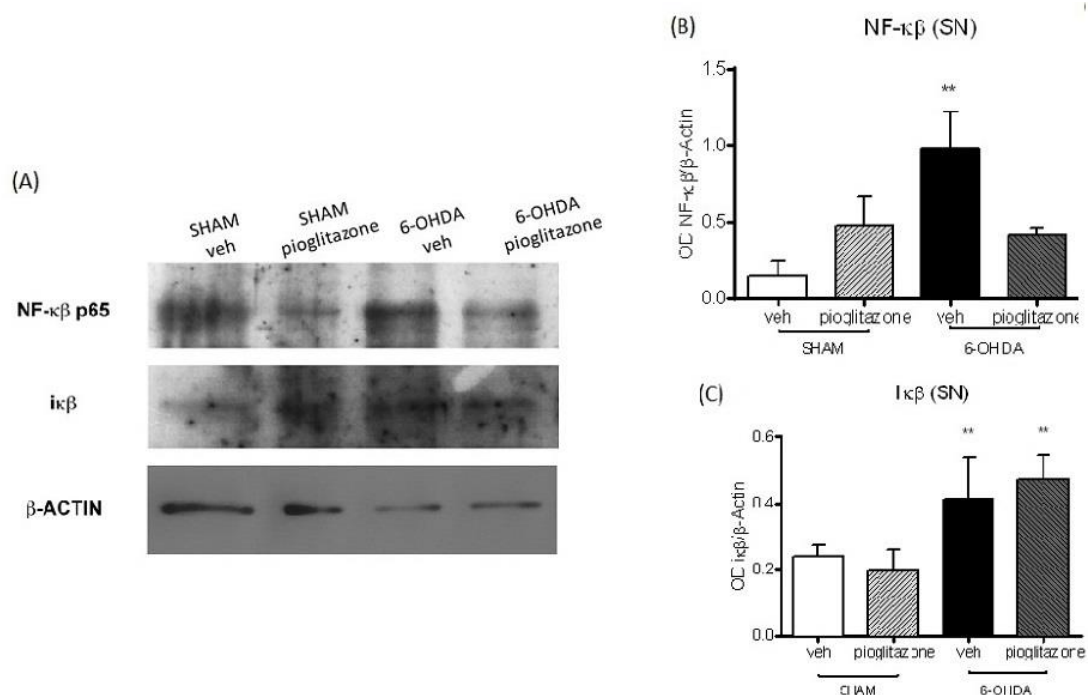


Figure 3. NF- κ B (p65) and I κ B expression in brain lysates from SN by western blot in rats 21 days after the surgery. (A) Western blot of the extracts protein. (B) Quantification of the NF- κ B (p65) expression and (C) I κ B expression by densitometry. The data are normalized to the densitometry of β -actin bands. The data are expressed as mean \pm SEM ($n = 6$ /group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ compared with the sham+veh group; # $p < 0.001$ compared with the 6-OHDA+veh group (Student's t -teste).

3.5. NF- κ B activation

NF- κ B is a cytoplasmic protein that when activated it is translocated to the nucleus. 6-OHDA+veh group presented an increase of 114% of cells number p65 positives (+) (Figure 4) showing that there is an increase of the NF- κ B

activation due the larger reactivity in the nucleus compared with the sham+veh group ($p < 0.05$; Figure 4b). The 6-OHDA+pioglitazone group showed an increase of 52% of cells p65 positives when compared to 6-OHDA+veh group, but it was not significant. Significant difference was found between the treatments ($F_{3,28} = 3.641$; $p = 0.0246$).

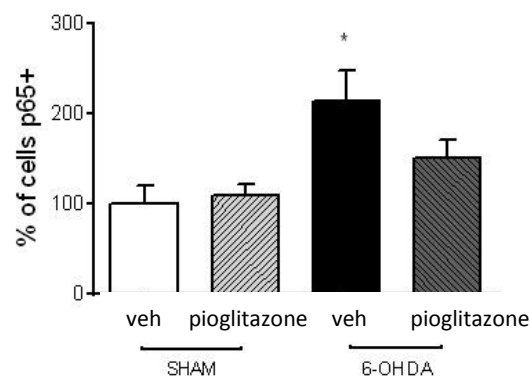
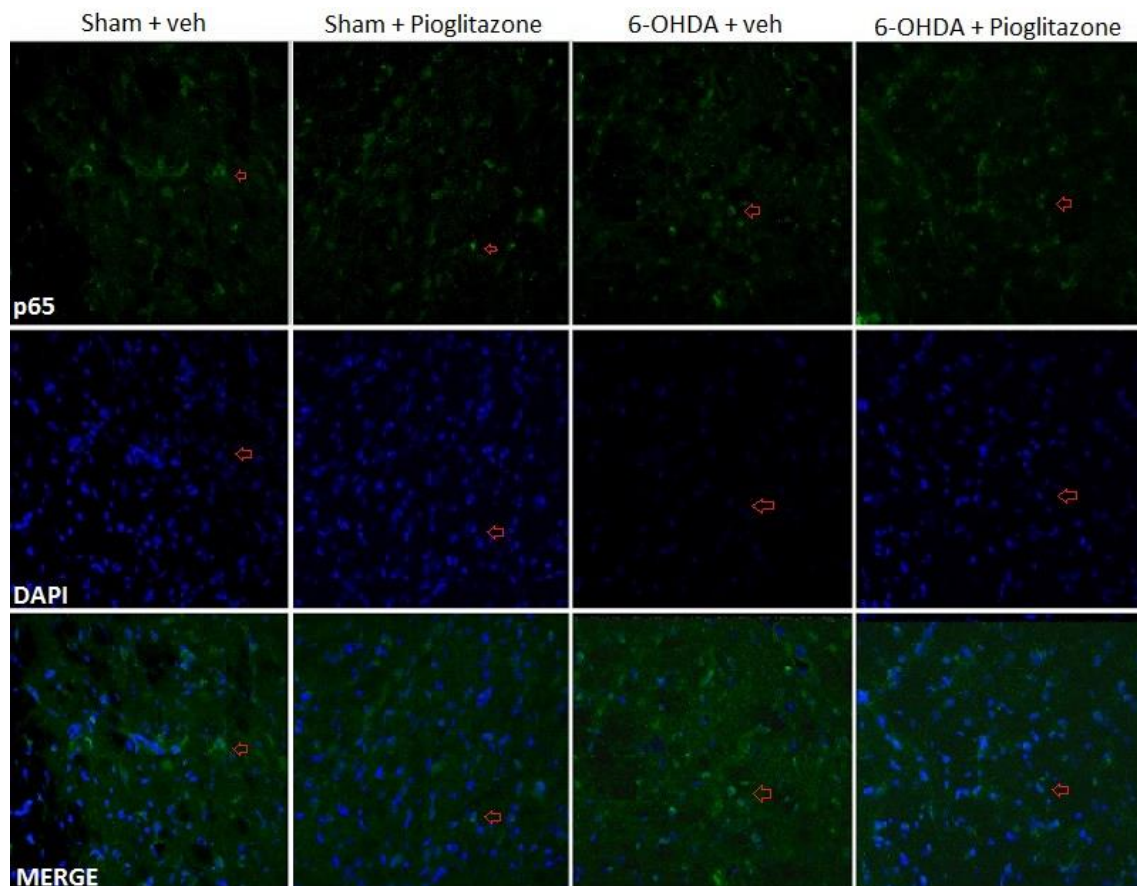


Figure 4. Percentage (%) of cells with colocalization by p65 in the SNc in rats 21 days after the surgery. (A) Immunohistochemistry with fluorescence DAPI (blue) and p65 (green - 400x magnification). (B) Quantification of % of cells p65+. 6-OHDA+veh group had increase of 114% in the p65+ cells compared with the Sham+veh. 6-OHDA+pioglitazone had not different from Sham+veh, however had difference of 62% from 6-OHDA+veh. The data were expressed with mean \pm SEM ($n = 4$ /group). * $p < 0.05$ compared with the sham+veh group (one-way ANOVA followed by Tukey's test).

4. Discussion

The present study demonstrated that pioglitazone was able to protect the dopaminergic neurons preventing the loss of TH-ir neurons in the SN. Pioglitazone treatment reduced microglia activation and decreased the total number of microglia cells in the SN that was observed through of cell reactivity to Iba-1. NF- κ B activation was inhibited due the reduction of p65+ cells and although NF- κ B was not significantly reduced (Figure 3b), we observed a strong tendency to decrease of NF- κ B expression in animals treated with pioglitazone. Besides, pioglitazone was able to reverse the motor impairment induced by 6-OHDA.

Intranigral injection of 6-OHDA causes a hypolocomotion in the rats after the surgery, being this motor dysfunction seen in others studies that used this PD model (Lima et al., 2006; Gradowski et al., 2013). Pioglitazone was able to recover the motor function of these animals after one week from the surgery.

TH is the rate-limiting enzyme of the catecholamine synthesis and is used as an indicator of dopaminergic neuronal loss in animal models of PD (Lima et al., 2012; Santiago et al., 2010; Yu et al., 2004). In the 6-OHDA group is observed a significant reduction of the TH-ir neurons (Figure 1) in the SNc 21 days after the surgery. This reduction of the TH-ir neurons caused by 6-OHDA was shown in many studies (Blesa et al., 2012; Kuter et al., 2011). Most importantly, the animals treated with pioglitazone did not present significant reduction showing that even with the toxin injected in this structure, pioglitazone protected against the neuronal death. In the MPTP model, Barbiero et al. (2014) observed similar result and also showed that pioglitazone partially prevent the striatal dopamine loss.

Our study showed that 6-OHDA activates and recruits the microglial cells (Figure 2b, 2c). An extensive activation of microglial cells is observed both in patients with PD and in animal models of PD with increased levels of inflammatory mediators secreted by microglia, neurons and astrocytes (Hunot et al., 1997; Machado et al., 2011). In this line, similar findings were observed by other groups. For example, administration of 6-OHDA into the SN promoted an increase of 32% in the number of activated microglia after 3 days and 55%

after 1 week (He et al., 2001). Microglial recruitment also is observed in non-human primate models of PD. Barcia et al., (2004), administering intravenous MPTP in monkeys during two years were able to observe the microglia reaction one year after the last administration of the toxin.

The persistent pathological stimulus leads to an increase of microglia proliferation that become phagocytic, produce adhesion molecules and form a cluster of cells around damaged dopaminergic neurons that are phagocytized. This causes the progressive and irreversible death of the injured dopaminergic neurons that release chemoattractants stimulating even more the microglial infiltration and impair the surviving neurons (Whitton, 2007). Once activated the microglia release different cytotoxic factors including pro-inflammatory cytokines, chemokines, growth-factors, prostaglandin, eicosanoids and products of oxidative stress like reactive oxygen/nitrogen species that, associated with the increase of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), amplify the neurodegeneration (Carta and Pisanu, 2013; Herrero et al., 2015). The present data show that the lesioned rats treated with pioglitazone presented a reduction of the activation and proliferation of microglia in the SN (Figure 2). Corroborating our study, other studies show similar effects of the pioglitazone treatment in the reduction of microglia activation in the 6-OHDA and MPTP models (Braidert et al., 2002; Sadeghian et al., 2012). The effects of the pioglitazone against the microglia activation are related with the reduction of the production of pro-inflammatory cytokines through of the inhibition of the NF- κ B and with a possible stimulation of the production anti-inflammatory cytokines (Carta and Pisanu, 2013).

The increase of pro-inflammatory cytokines produced by microglia stimulates the up-regulation of the NF- κ B signaling pathways that play a key role in the regulation of inflammation and oxidative stress (Leonard and Maes, 2012). Here, we observed that SN of 6-OHDA injected animals presented an increase of NF- κ B expression (Figure 3b) with a high activation of p65, as observed by translocation of p65 to the nucleus (Figure 4). In the 6-OHDA model many authors demonstrated the NF- κ B activation (Cao et al., 2008; Levites et al., 2002; Liang et al., 2007; Tarabin and Schwaninger, 2004). When not activated, NF- κ B remains in the cytoplasm linked to an inhibitory protein

known as I κ B. Degradation of I κ B upon its phosphorylation by I κ B kinase (IKK) in serine and tyrosine residues, leads to activation and nuclear translocation of NF- κ B (Glezer et al., 2000).

Many pro-inflammatory cytokines such IL-1 β and TNF- α can promote the activation of the IKK with subsequent phosphorylation of the I κ B (Thakur and Nehru, 2013), releasing NF- κ B which is then translocated to nucleus where binds to the κ B sites of genes controlling the transcription of genes involved in the immune response (Gilmore, 2006; Glezer et al., 2000; Li et al., 2011; Troib and Azab, 2015).

Once activated, NF- κ B promotes the up-regulation of inflammatory cytokines, being that low levels of cytokines stimulate the production and release of neurotrophic factors as brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and glial-derived neurotrophic factor (GDNF) in an attempt of protect the neuron against a possible damage (Phani et al., 2012; Thakur and Nehru, 2013). However, higher levels of cytokines, as observed in PD, activate inflammatory pathways beyond this protective role and may activate apoptotic pathways increasing the neurodegeneration process (Thakur and Nehru, 2013).

Our data corroborates previous data observed in the MPTP mice model of PD (Dehmer et al. 2004), where was observed a reduction of NF- κ B expression in animals treated with pioglitazone. In addition, recently was observed that pioglitazone was able to prevent the translocation and activation of NF- κ B in a mouse model of nephrotoxicity (Zhang et al., 2016). It was hypothesized that PPAR- γ activation can induce the up regulation of I κ B protein, confining the p65/p50 to the cytosol and, thus, inhibiting its nuclear translocation (Ridder and Schwaninger, 2012; Yin et al., 2001). As opposed to other studies, it was not observed significant increase in I κ B levels between 6-OHDA injected animals treated with vehicle or pioglitazone (Dehmer et al., 2004) suggesting that there are others mechanisms behind of reduction of NF- κ B activation.

Other mechanisms that might be associated with the inhibition of NF- κ B activation involve a direct interaction with the PPAR- γ , whom might translocate p65 from nucleus to the cytoplasm or induce the degradation of the p65/p50 complex. On the other hand might occur a competition between the NF- κ B and the PPAR- γ by coactivator proteins that are essential to initiate the transcription

(Sauer, 2015). In addition, PPAR- γ could compete for promoter regions on the DNA, where NF- κ B would bind and then blocking its function (Sauer, 2015; Yin et al., 2001).

Many neuroprotective effects are associated with the PPAR- γ activation by synthetic agonists such pioglitazone and rosiglitazone. These effects are related with the anti-inflammatory activity by reduction of COX-2 activity, reduction of pro-inflammatory cytokines expression (Carta and Pisanu, 2013; Liu et al., 2016; Ridder and Schwaninger, 2012) and by reduction of the microglia and NF- κ B activation like described in this study. Our study show that pioglitazone was able to reduce the activation of NF- κ B in the 6-OHDA model (Figure 4) and show a strong trend in reducing levels of expression of NF- κ B, suggesting that there could be a reduction of an inflammatory process unleashed by NF- κ B. Other pioglitazone's effects such oxidative stress have been reported with the reduction of iNOS and nitric oxide production (Ridder and Schwaninger, 2012). Reduction of caspase-3 activation, protection against depletion of dopamine and its metabolites in the striatum (Barbiero et al., 2014) and MAO-B inhibition (Quinn et al., 2008) also were described as pioglitazone effects.

In conclusion, pioglitazone was able to attenuate the motor impairment caused by 6-OHDA in rats. This PPAR- γ agonist protected the dopaminergic neurons of SN against the neuronal death and also was able of reduces the microglia activation and reduces the NF- κ B activation. Several studies show that the effects obtained with pioglitazone pointing it to have a potent neuroprotective effect against various mechanisms involved in the progression of neurodegeneration in PD. So, the results presented in this study indicate that pioglitazone has a potential to be used in the clinic as an adjuvant in the treatment of patients with Parkinson's disease.

Funding and Disclosure

This work was supported by grants from CNPq, CAPES and Fundação Araucária – Governo do Estado do Paraná, which had no further role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the paper for publication. MABFV, RA and SMZ are recipient of a CNPq fellowship.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

References

- Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Lima, M.M.S., Ariza, D., Morais, L.H., Andreatini, R., Vital, M.A.B.F., 2011. Acute but not chronic administration of pioglitazone promoted behavioral and neurochemical protective effects in the MPTP model of Parkinson's disease. *Behav. Brain Res.* 216, 186-192.
- Barbiero, J.K., Santiago, R.M., Persike, D.S., da Silva Fernandes, M.J., Tonin, F.S., da Cunha, C., Lucio Boschen, S., Lima, M.M.S., Vital, M.A.B.F., 2014. Neuroprotective effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists in model of parkinsonism induced by intranigral 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Behav. Brain Res.* 274, 390-399.
- Barcia, C., Sánchez, B.A., Fernández-Villalba, E., Bautista, V., Poza, Y., Poza, M., Fernández-Barreiro, A., 2004. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonism monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia* 46, 402-409.
- Blandini, F., 2013. Neural and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. *J. Neuroimmune Pharmacol* 8, 189-201.
- Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S., 2012. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1-10.
- Breider, T., Callebert, J., Heneka, M.T., Landreth, G., Launay, J.M., Hirsch, E.C., 2002. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 82, 615-624.
- Cao, J.P., Wang, H.J., Yu, J.K., Liu, H.M., Gao, D.S., 2008. The involvement of NF- κ B p65/p52 in the effects of GDNF on DA neurons in early PD rats. *J. Neurochem.* 76, 505-511.
- Carta, A.R., Pisanu, A., 2013. Modulating microglia activity with ppar- γ agonists: A promising therapy for parkinson's disease? *Neurotox. Res.* 23, 112-123.
- Connolly, B.S., Lang, A.E., 2014. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease. *Jama* 311, 1670-1683.
- Dauer, W., Przedborski, S., 2003. Parkinson's disease: Mechanisms and models. *Neuron* 39, 889-909.
- De Filippis, B., Linciano, P., Ammazalorso, A., Di Giovanni, C., Fantacuzzi, M., Giampietro, L., Laghezza, A., Maccallini, C., Tortorella, P., Lavecchia, A., Liodice, F., Amoroso, R., 2015. Structural development studies of PPARs ligands based on tyrosine scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* 89, 817-825.
- Dehmer, T., Heneka, M.T., Sastre, M., Dichgans, J., Schulz, J.B., 2004. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B α induction and block of NF- κ B and iNOS activation. *J. Neurochem.* 88, 494-501.
- Gao, H.M., Jiang, J., Wilson, B., Zhang, W., Hong, J.S., Liu, B., 2002. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 81, 1285-1297.
- Gilmore, T., 2006. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives.

- Oncogene 25, 6680–6684.
- Glezer, I., Marcourakis, T., Christina, M., Avellar, W., Gorenstein, C., Scavone, C., 2000. The role of the transcription factor NF- κ B in the molecular mechanisms of action of psychoactive drugs. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 22, 26–30.
- Gradowski, R.W., Santiago, R.M., Zaminelli, T., Bassani, T.B., 2013. Antidepressant-like effect of curcumin in 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease 7, 69–80.
- Hawkes, C.H., Del Tredici, K., Braak, H., 2010. A timeline for Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 16, 79–84.
- He, Y., Appel, S., Le, W., 2001. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res.* 909, 187–193.
- Herrero, M.-T., Estrada, C., Maatouk, L., Vyas, S., Blesa, J., Labandeira-Garcia, J.L., 2015. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. *Frontiers Neuroanatomy.* 9, 1–12.
- Hirsch, E.C., Jenner, P., Przedborski, S., 2013. Pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 28, 24–30.
- Hirsch, E.C., Vyas, S., Ephane Hunot, S., 2012. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 18, S210–S212.
- Hong, H., Kim, B.S., Im, H., 2016. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Int. Neurol.* 1, 2–7.
- Hunot, S., Brugg, B., Ricard, D., Michel, P.P., Muriel, M.P., Ruberg, M., Faucheux, B. a, Agid, Y., Hirsch, E.C., 1997. Nuclear translocation of NF- κ B is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 7531–7536.
- Kalia, L. V, Lang, A.E., Shulman, G., 2015. Parkinson's disease. *Lancet* 386, 896–912.
- Kuter, K., Kolasiewicz, W., Gołembowska, K., Dziubina, A., Schulze, G., Berghauzen, K., Wardas, J., Ossowska, K., 2011. Partial lesion of the dopaminergic innervation of the ventral striatum induces “depressive-like” behavior of rats. *Pharmacol. Reports.* 63, 1383–1392.
- Lee, Y., Umasuthan, N., Whang, I., Saranya, K., Lee, S., Zoysa, M. De, Oh, C., 2014. Fish & Shellfish Immunology Two NF- κ B inhibitor- α (I κ B α) genes from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular characterization, genomic organization and mRNA expression analysis after immune stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 633–642.
- Leonard, B., Maes, M., 2012. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. *Neurosci. Biobehav.* 36, 764–785.
- Levites, Y., Youdim, M.B.H., Maor, G., Mandel, S., 2002. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures. *Biochemical Pharmacol.* 63, 21–29.
- Li, X., Wu, G., Wu, M., Chen, W., Liu, X., 2011. In vitro study of inhibitory millimeter wave treatment effects on the TNF- α -induced NF- κ B signal transduction pathway. *Int. J. Mol. Med.* 27, 71–78.

- Liang, Z., Li, Y., Zhao, X., Han, R., Wang, X., Wang, Y., Chase, T.N., Bennett, M.C., Qin, Z., 2007. NF- κ B contributes to 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of nigral dopaminergic neurons through p53. *Brain Research*. 1145, 190-203.
- Lima, M.M.S., Andersen, M.L., Reksidler, A.B., Ferraz, A.C., Vital, M. a B.F., Tufik, S., 2012. Paradoxical sleep deprivation modulates tyrosine hydroxylase expression in the nigrostriatal pathway and attenuates motor deficits induced by dopaminergic depletion. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 11, 359–68.
- Lima, M.M.S., Reksidler, A.B., Zanata, S.M., Machado, H.B., Tufik, S., Vital, M.A.B.F., 2006. Different parkinsonism models produce a time-dependent induction of COX-2 in the substantia nigra of rats. *Brain Res.* 1101, 117–125.
- Liu, M., Bachstetter, A.D., Cass, W.A., Lifshitz, J., Bing, G., 2016. Pioglitazone attenuates neuroinflammation and promotes dopaminergic neuronal survival in the nigrostriatal system of rats after diffuse brain injury. *J. Neurotrauma*. 33, 1-9.
- Liu, Y., Nakahara, T., Miyakoshi, J., Hu, D.-L., Nakane, A., Abe, Y., 2007. Nuclear Accumulation and Activation of Nuclear Factor κ B after Split-dose Irradiation in LS174T Cells. *J. Radiat. Res. J. Radiat. Res* 48, 13–20.
- Luengo Blanco, M., Neto, A.C., 2003. Nuclear factor kappa B: a new perspective for the study of antiinflammatory drugs. *Rev. Cienc. Med.* 12, 341–349.
- Machado, A., Herrera, A.J., Venero, J.L., Santiago, M., De Pablos, R.M., Villarán, R.F., Espinosa-Oliva, A.M., Argüelles, S., Sarmiento, M., Delgado-Cortés, M.J., Mauriño, R., Cano, J., 2011. Peripheral Inflammation Increases the Damage in Animal Models of Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration: Possible Implication in Parkinson's Disease Incidence. *Res. Park. Dis.* 2011, 1-10.
- Magnard, R., Vachez, Y., Carcenac, C., Krack, P., David, O., Savasta, M., Boulet, S., Carnicella, S., 2016. What can rodent models tell us about apathy and associated neuropsychiatric symptoms in Parkinson's disease? *Transl. Psychiatry* 6, e753–11.
- Nolan, Y.M., Sullivan, A.M., Toulouse, A., 2013. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol. Med.* 19, 187-196.
- Phani, S., Loike, J.D., Przedborski, S., 2012. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18, Supple, S207 – S209.
- Quinn, L., Crook, B., Hows, M., Vidgeon-Hart, M., Chapman, H., Upton, N., Virley, D., 2008. The PPARc agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br. J. Pharmacol.* 15478, 226–233.
- Ridder, D.A., Schwaninger, M., 2012. In search of the neuroprotective mechanism of thiazolidinediones in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 238, 133-137.
- Sadaghiani, M.S., Javadi-Paydar, M., Gharedaghi, M.H., Fard, Y.Y., Dehpour, A.R., 2011. Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: The role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. *Behav. Brain.* 224, 336-343.

- Sadeghian, M., Marinova-mutafchieva, L., Broom, L., Davis, J.B., Virley, D., Medhurst, A.D., Dexter, D.T., 2012. Full and partial peroxisome proliferation-activated receptor-gamma agonists, but not delta agonist, rescue of dopaminergic neurons in the 6-OHDA Parkinsonian model is associated with inhibition of microglial activation and MMP expression. *J. Neuroimmunol.* 246, 69–77.
- Salat, D., Noyce, A.J., Schrag, A., Tolosa, E., 2016. Challenges of modifying disease progression in pre-diagnostic Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 15, 637–648.
- Santiago, R.M., Barbiero, J., Lima, M.M.S., Dombrowski, P.A., Andreatini, R., Vital, M.A.B.F., 2010. Depressive-like behaviors alterations induced by intranigral MPTP, 6-OHDA, LPS and rotenone models of Parkinson's disease are predominantly associated with serotonin and dopamine. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry.* 34, 1104-1114.
- Santiago, R.M., Tonin, F.S., Barbiero, J., Zaminelli, T., Boschen, S.L., Andreatini, R., Da Cunha, C., Lima, M.M.S., Vital, A.M.A.B.F., 2015. The nonsteroidal anti-inflammatory drug piroxicam reverses the onset of depressive-like behavior in 6-OHDA animal model of Parkinson's disease. *Neuroscience* 300, 246–253.
- Saoirse, C., Sullivan, E.O., Hospital, R.D., Sullivan, S.E.O., 2016. An update on PPAR activation by cannabinoids. *Brit. J. Pharmacol.* 173, 1899-1910.
- Sauer, S., 2015. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends Pharmacol.* 36, 688-704.
- Schapira, A.H. V., 2009. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol.* 30, 41-47.
- Tarabin, V., Schwaninger, M., 2004. The role of NF- κ B in 6-hydroxydopamine- and TNF α -induced apoptosis of PC12 cells. *Arch. Pharmacol.* 369, 563–569.
- Thakur, P., Nehru, B., 2013. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience.* 213, 420-431.
- Troib, A., Azab, A.N., 2015. Effects of psychotropic drugs on Nuclear Factor kappa B. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19, 1198–1208.
- Whitton, P., 2007. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150, 963–976.
- Yin, Y., Allen, P.D., Jia, L., Kelsey, S.M., Newland, A.C., 2001. 8-Cl-adenosine mediated cytotoxicity and sensitization of T-lymphoblastic leukemia cells to TNF α -induced apoptosis is via inactivation of NF- κ B. *Leukemia Research.* 25, 423–431.
- Yu, S., Zuo, X., Li, Y., Zhang, C., Zhou, M., Zhang, Y.A., Uéda, K., Chan, P., 2004. Inhibition of tyrosine hydroxylase expression in alpha-synuclein-transfected dopaminergic neuronal cells. *Neurosci. Lett.* 367, 34–9.
- Zhang, J., Zhang, Y., Xiao, F., Liu, Y., Wang, J., Gao, H., Rong, S., Yao, Y., Li, J., Xu, G., 2016. The peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone prevents NF- κ B activation in cisplatin nephrotoxicity through the reduction of p65 acetylation via the AMPK-SIRT1/p300 pathway. *Biochem. Pharmacol.* 101, 100–111.

4. CONCLUSÃO

O tratamento com pioglitazona (30 mg/kg v.o. por 5 dias) iniciado após a infusão da toxina, foi capaz de reestabelecer a função motora dos ratos no campo aberto logo no 7º dia após a cirurgia.

A administração da 6-OHDA provocou redução dos neurônios TH-ir (42%) na SNpc, enquanto a pioglitazona foi capaz de proteger contra a perda dos neurônios dopaminérgicos.

A 6-OHDA provocou aumento das células micróglia (79%) com aumento de micróglia ativadas (50%) na SNpc. Por outro lado, o tratamento com pioglitazona foi capaz de reduzir a proliferação microglial (50%) com redução de células microgliais ativadas (50%).

A 6-OHDA promoveu o aumento da expressão do NF-κB com aumento de núcleos p65 positivos na SN. Ao contrário, o tratamento com pioglitazona apresentou uma tendência de redução da reatividade da p65 nuclear com diminuição da expressão do NF-κB.

REFERÊNCIAS

'EPISCOPO, F.L., TIROLO, C., TESTA, N., CANIGLIA, S., MORALE, M.C., MARCHETTI, B.. Reactive astrocytes are key players in nigrostriatal dopaminergic neurorepair in the MPTP mouse model of Parkinson's disease: focus on endogenous neurorestoration. *Curr. Aging Sci.* 6: 45–55, 2013.

AARSLAND, D., AARSLAND, D., PAHLHAGEN, S., BALLARD, C.G., EHRT, U., SVENNINGSSON, P.. Depression in Parkinson disease - epidemiology, mechanisms and management. *Nat. Publ. Gr.* 8: 35-47, 2012.

BARBIERO, J.K., SANTIAGO, R.M., PERSIKE, D.S., DA SILVA FERNANDES, M.J., TONIN, F.S., DA CUNHA, C., LUCIO BOSCHEN, S., LIMA, M.M.S., VITAL, M.A.B.F.. Neuroprotective effects of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma agonists in model of parkinsonism induced by intranigral 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Behav. Brain Res.* 274: 390-399, 2014.

BARCIA, C., SÁNCHEZ BAHILLO, A., FERNÁNDEZ-VILLALBA, E., BAUTISTA, V., POZA Y POZA, M., FERNÁNDEZ-BARREIRO, A., HIRSCH, E.C., HERRERO, M.T.. Evidence of active microglia in substantia nigra pars compacta of parkinsonian monkeys 1 year after MPTP exposure. *Glia*.46: 402-409, 2004.

BLANCO, M., NETO, A.C.. Nuclear factor kappa B: a new perspective for the study of antiinflammatory drugs. *Rev. Cienc. Med.* 12: 341–349, 2003.

BLANDINI, F.. Neural and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Parkinson's Disease. 8: 189-201, 2013.

BLESA, J., PHANI, S., JACKSON-LEWIS, V., PRZEDBORSKI, S.. Classic and new animal models of Parkinson's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 1-10, 2012.

BRAAK, H., GHEBREMEDHIN, E., RÜB, U., BRATZKE, H., DEL TREDICI, K.. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell Tissue Res.* 318: 121-134, 2004.

BREIDERT, T., CALLEBERT, J., HENEKA, M.T., LANDRETH, G., LAUNAY, J.M., HIRSCH, E.C.. Protective action of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist pioglitazone in a mouse model of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 82: 615-624, 2002.

CABEZAS, R., ÁVILA, M., GONZALEZ, J., SANTOS EL-BACHÁ, R., BÁEZ, E., GARCÍA-SEGURA, L.M., CAMILO, J., CORONEL, J., CAPANI, F., CARDONA-GOMEZ, G.P., BARRETO, G.E., TAQUINI, A.C., LIU, P.. Astrocytic modulation of blood brain barrier: perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neurosc.* 8: 1-11, 2014.

CARTA, A.R., PISANU, A.. Modulating microglia activity with ppar-?? agonists: A promising therapy for parkinson's disease? *Neurotox. Res.* 23: 112-123, 2013.

CONNOLLY, B.S., LANG, A.E.. Pharmacological Treatment of Parkinson Disease. *Jama* 311: 1670-1683, 2014.

DE FILIPPIS, B., LINCIANO, P., AMMAZZALORSO, A., DI GIOVANNI, C., FANTACUZZI, M., GIAMPIETRO, L., LAGHEZZA, A., MACCALLINI, C., TORTORELLA, P., LAVECCHIA, A., LOIODICE, F., AMOROSO, R.. Structural development studies of PPARs ligands based on tyrosine scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* 89: 817-825, 2015.

DEHMER, T., HENEKA, M.T., SASTRE, M., DICHGANS, J., SCHULZ, J.B.. Protection by pioglitazone in the MPTP model of Parkinson's disease correlates with I κ B α induction and block of NF- κ B and iNOS activation. *J. Neurochem* 88: 494–501, 2004.

DUNNING, C.J.R., REYES, J.F., STEINER, J.A., BRUNDIN, P.. Can Parkinson's disease pathology be propagated from one neuron to another? *Prog. Neurobiol.* 97: 205-219, 2012.

FRANCO, D.G.. Nuclear transcription factor kappa B in central nervous system? From physiological to pathological. *Rev. Biologia.* 4:35-39, 2010.

GAO, H.M., JIANG, J., WILSON, B., ZHANG, W., HONG, J.S., LIU, B.. Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: Relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 81: 1285-1297, 2002.

GIBB, W.R., LEES, A.J.. The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 51: 745–752, 1988.

GILMORE, T.. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene.* 25: 6680–6684, 2006.

GOMES, M.B.. Glitazona e síndrome metabólica: mecanismos de ação, fisiopatologia e indicações terapêuticas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 50: 271-280, 2006.

HAIM, L. BEN, SAUVAGE, M.C., CEYZÉRIAT, K., CURTIN, J.F.. Elusive roles for reactive astrocytes in neurodegenerative diseases. *Frontier in Cell Neurosci.* 9: 1-27, 2015.

HAWKES, C.H., DEL TREDICI, K., BRAAK, H.. A timeline for Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord.* 16: 79–84, 2010.

HE, Y., APPEL, S., LE, W.. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. *Brain Res.* 909, 187–193, 2001.

HERRERO, M.-T., ESTRADA, C., MAATOUK, L., VYAS, S., BLESÁ, J., Labandeira-Garcia, J.L.. Inflammation in Parkinson's disease: role of glucocorticoids. *Frontiers Neuroanatomy.* 9:1-12, 2015.

HIRSCH, E.C., VYAS, S., EPHANE HUNOT, S.. Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Park. Realt. Disord.* 18: S210–S212, 2012.

HONG, H., KIM, B.S., IM, H.. Pathophysiological Role of Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases and Psychiatric Disorders. *Int. Neurorol. J.* 1: 2–7, 2016.

HUNOT, S., BRUGG, B., RICARD, D., MICHEL, P.P., MURIEL, M.P., RUBERG, M., FAUCHEUX, B. A, AGID, Y., HIRSCH, E.C.. Nuclear translocation of NF-kappaB is increased in dopaminergic neurons of patients with parkinson disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 7531–7536, 1997.

KANNARKAT, G.T., BOSS, J.M., TANSEY, M.G.. The role of innate and adaptive immunity in parkinson's disease. *J. Parkinsons. Dis.* 3: 493-514, 2013.

KERSTEN, S., SEYDOUX, J., PETERS, J.M., GONZALES, F.J., DESVERGNE, B., WAHLI, W.. Peroxisome proliferator-activated receptor α mediates the adaptive response to fasting. *J. of Clinical Investigation* 103:1489-1498, 2014.

KLIEWER, S.A., FORMAN, B.M., BLUMBERG, B., ONGT, E.S., BORGMEYER, U., MANGELSDORFT, D.J., UMESONO, K., EVANSO, A.R.M.. Differential expression and activation of a family of murine peroxisome proliferator-activated receptors. *Physiology* 91: 7355–7359, 1994.

KROKER, A.J., BRUNING, J.B.. Review of the structural and dynamic mechanisms of PPAR γ partial agonism. *PPAR Res.* 816856: 1-15, 2015.

KUTER, K., KOLASIEWICZ, W., GOŁEMBIOWSKA, K., DZIUBINA, A., SCHULZE, G., BERGHAUZEN, K., WARDAS, J., OSSOWSKA, K.. Partial lesion of the dopaminergic innervation of the ventral striatum induces "depressive-like" behavior of rats. *Pharmacol. Reports.* 63: 1383-1392, 2011

LEE, Y., UMASUTHAN, N., WHANG, I., SARANYA, K., LEE, S., ZOYSA, M. DE, OH, C.. Fish & Shellfish Immunology Two NF- κ B inhibitor-alpha (I κ B α) genes from rock bream (*Oplegnathus fasciatus*): Molecular characterization, genomic organization and mRNA expression analysis after immune stimulation. *Fish Shellfish Immunol.* 41, 633–642, 2014.

LEONARD, B., MAES, M.. Mechanistic explanations how cell-mediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar

depression. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 36:764-785, 2012.

LEVITES, Y., YODIM, M.B.H., MAOR, G., MANDEL, S.. Attenuation of 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced nuclear factor-kappaB (NF- κ B) activation and cell death by tea extracts in neuronal cultures 63: 21–29, 2002.

LIU, Y., NAKAHARA, T., MIYAKOSHI, J., HU, D.-L., NAKANE, A., ABE, Y.. Nuclear Accumulation and Activation of Nuclear Factor κ B after Split-dose Irradiation in LS174T Cells. *J. Radiat. Res.* 48: 13–20, 2007.

MCGEER, P.L., ITAGAKI, S., BOYES, B.E., MCGEER, E.G.. Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology.* 38:1285–1291, 1988.

MÉMET, S.. NF- κ B functions in the nervous system: From development to disease. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1180–1195, 2006.

MACHADO, A., HERRERA, A.J., VENERO, J.L., SANTIAGO, M., DE PABLOS, R.M., VILLARÁN, R.F., ESPINOSA-OLIVA, A.M., ARGÜELLES, S., SARMIENTO, M., DELGADO-CORTÉS, M.J., MAURIÑO, R., CANO, J.. Peripheral Inflammation Increases the Damage in Animal Models of Nigrostriatal Dopaminergic Neurodegeneration: Possible Implication in Parkinson's Disease Incidence. *Res. Park. Dis.* 2011: 1-10, 2011.

NOLAN, Y.M., SULLIVAN, A.M., TOULOUSE, A.. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation. *Trends Mol. Med.* 19: 187-196, 2013.

OHTSUKA, C., SASAKI, M., KONNO, K., KOIDE, M., KATO, K., TAKAHASHI, J., TAKAHASHI, S., KUDO, K., YAMASHITA, F., TERAYAMA, Y.. Changes in substantia nigra and locus coeruleus in patients with early-stage Parkinson's disease using neuromelanin-sensitive MR imaging. *Neurosci. Lett.* 514: 93-98, 2013.

PHANI, S., LOIKE, J.D., PRZEDBORSKI, S.. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat. Disord.* 18: Supple, S207–S209, 2012.

PISANU, A., LECCA, D., MULAS, G., WARDAS, J., SIMBULA, G., SPIGA, S., CARTA, A.R.. Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- γ agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. *Neurobiol. Dis.* 71: 280-291, 2014.

PRANSKI, E., SANFORD, C.D. VAN, DALAL, N., ORR, A.L., KARMALI, D., COOPER, D.S., GEARING, M., LAH, J.J., LEVEY, A.I., BETARBET, R., EDU, E.. NF- κ B activity is inversely correlated to RNF11 expression in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 547: 16-20, 2014.

QIAN, L., FLOOD, P.M., HONG, J.S.. Neuroinflammation is a key player in

Parkinson's disease and a prime target for therapy. *J. Neural Transm.* 2010.

QUINN, L., CROOK, B., HOWS, M., VIDGEON-HART, M., CHAPMAN, H., UPTON, N., VIRLEY, D.. The PPARc agonist pioglitazone is effective in the MPTP mouse model of Parkinson's disease through inhibition of monoamine oxidase B. *Br. J. Pharmacol.* 15478: 226–233, 2008.

QUINTANILLA, R.A., UTRERAS, E., CABEZAS-OPAZO, F.A.. Role of PPAR γ in the differentiation and function of neurons. *PPAR Res.* 768597: 1-9, 2014.

RIDDER, D.A., SCHWANINGER, M.. In search of the neuroprotective mechanism of thiazolidinediones in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 238: 133-137, 2012.

RIGAMONTI, E., FONTAINE, C., LEFEBVRE, B., DUHEM, C., LEFEBVRE, P., MARX, N., STAELS, B., CHINETTI-GBAGUIDI, G.. Induction of CXCR2 Receptor by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Human Macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 932-939, 2008.

ROS-BERNAL, F., HUNOT, S., TRINIDAD HERRERO, M., PARNADEAU, S., CORVOL, J.-C., LU, L., ALVAREZ-FISCHER, D., CARRILLO-DE SAUVAGE, M.A., SAURINI, F., COUSSIEU, C., KINUGAWA, K., PRIGENT, A., HÖGLINGER, G., HAMON, M., TRONCHE, F., HIRSCH, E.C., VYAS, S.. Microglial glucocorticoid receptors play a pivotal role in regulating dopaminergic neurodegeneration in parkinsonism. *PNAS.* 108: 6632-6637, 2011.

SADAGHIANI, M.S., JAVADI-PAYDAR, M., GHAREDAGHI, M.H., FARD, Y.Y., DEHPOUR, A.R.. Antidepressant-like effect of pioglitazone in the forced swimming test in mice: The role of PPAR-gamma receptor and nitric oxide pathway. *Behav. Brain Res.* 224: 336-343, 2011.

SANTIAGO, R.M., BARBIERO, J., GRADOWSKI, R.W., BOCHEN, S., LIMA, M.M.S., DA CUNHA, C., ANDREATINI, R., VITAL, M.A.B.F.. Induction of depressive-like behavior by intranigral 6-OHDA is directly correlated with deficits in striatal dopamine and hippocampal serotonin. *Behav. Brain Res.* 259: 70-77, 2014.

SAOIRSE, C., SULLIVAN, E.O., HOSPITAL, R.D., SULLIVAN, S.E.O.. An update on PPAR activation by cannabinoids 16. *Brit. J. Pharmacol.* 173: 1899-1910, 2016.

SAUER, S.. Ligands for the Nuclear Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. *Trends Pharmacol. Sci.* 36: 688-704, 2015

SCHAPIRA, A.H.V.. Neurobiology and treatment of Parkinson's disease. *Trends Pharmacol. Sci.* 30: 41-47, 2009.

SCHAPIRA, A.H. V, OLANOW, C.W., GREENAMYRE, J.T., BEZARD, E.. Slowing of neurodegeneration in Parkinson ' s disease and Huntington ' s

disease: future therapeutic perspectives. *Lancet* 384: 545–555, 2013.

THAKUR, P., NEHRU, B.. Anti-inflammatory properties rather than anti-oxidant capability is the major mechanism of neuroprotection by sodium salicylate in a chronic rotenone model of Parkinson's disease. *Neuroscience*. 213: 420-431, 2013.

TROIB, A., AZAB, A.N.. Effects of psychotropic drugs on Nuclear Factor kappa B. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 19: 1198–1208, 2015.

WELINDER, C., JÖNSSON, G.B., INGVAR, C., LUNDGREN, L., BALDETORP, B., OLSSON, H., BRESLIN, T., REZELI, M., JANSSON, B., FEHNIGER, T.E., LAURELL, T., WIESLANDER, E., PAWLOWSKI, K., MARKO-VARGA, G.. Analysis of alpha-synuclein in malignant melanoma - Development of a SRM quantification assay. *PLoS One*. 9: 1-9, 2014.

WHITTON, P.. Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *Br. J. Pharmacol.* 150: 963–976, 2007.

XING, B., LIU, M., BING, G.. Neuroprotection with pioglitazone against LPS insult on dopaminergic neurons may be associated with its inhibition of NF- κ B and JNK activation and suppression of COX-2 activity. *J. Neuroimmunol.* 192: 89–98, 2007.

YIN, Y., ALLEN, P.D., JIA, L., KELSEY, S.M., NEWLAND, A.C.. 8-Cl-adenosine mediated cytotoxicity and sensitization of T-lymphoblastic leukemia cells to TNF α -induced apoptosis is via inactivation of NF- κ B. *Leukemia Research*. 25: 423–431, 2001.

ZHANG, S., GU, H., HU, N.. Role of peroxisome proliferator-activated receptor γ in ocular diseases. *J. Ophthalmol.* 275435: 1-10, 2015.