

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Neurociências

Larissa Katharina Sabino Abreu

**ESTUDO DE SINTOMAS NÃO-MOTORES EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA DE PARKINSON POR INFUSÃO INTRANASAL DE MPTP: UMA
ANÁLISE COMPORTAMENTAL E IMUNOLÓGICA**

Belo Horizonte
2022

Larissa Katharina Sabino Abreu

**ESTUDO DE SINTOMAS NÃO-MOTORES EM MODELO EXPERIMENTAL DE
DOENÇA DE PARKINSON POR INFUSÃO INTRANASAL DE MPTP: UMA
ANÁLISE COMPORTAMENTAL E IMUNOLÓGICA**

Versão final

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Silva de Miranda

Belo Horizonte
2022

043

Abreu, Larissa Katharina Sabino.

Estudo de sintomas não-motores em modelo experimental de doença de Parkinson por infusão intranasal de MPTP: uma análise comportamental e imunológica [manuscrito] / Larissa Katharina Sabino Abreu. – 2022.

74 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aline Silva de Miranda.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Neurociências.

1. Neurociências. 2. Doença de Parkinson. 3. 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetra-Hidropiridina. 4. Neurite. 5. Fatores de Crescimento Neural. 6. Citocinas. I. Miranda, Aline Silva de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

FOLHA DE APROVAÇÃO

ESTUDO DE SINTOMAS NÃO-MOTORES EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOENÇA DE PARKINSON POR INFUSÃO INTRANASAL DE MPTP: UMA ANÁLISE COMPORTAMENTAL E IMUNOLÓGICA

LARISSA KATHARINA SABINO ABREU

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em NEUROCIÊNCIAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, área de concentração NEUROCIÊNCIAS CLÍNICAS.

Aprovada em 18 de janeiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Milene Alvarenga Rachid

UFMG

Prof(a). Paula Luciana Scalzo

UFMG

Prof(a). Aline Silva de Miranda - Orientadora

UFMG



Documento assinado eletronicamente por Aline Silva de Miranda, Servidor(a), em 28/01/2022, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a), em 01/02/2022, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Paula Luciana Scalzo, Professora do Magistério Superior, em 02/02/2022, às 09:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1187756 e o código CRC DC9F61FB.

AGRADECIMENTOS

Às pessoas que mais admiro nesta vida: meus pais, Isaias e Rozana que foram meu suporte e meu colo em todos os momentos que precisei. Que sempre estiveram ao meu lado, que me mostraram que a vida é feita de lutas e que nunca se deve parar de lutar. Que eu seja cada vez mais resiliente como vocês.

À minha irmã, Desirée pelo companheirismo, pelo amor e pelo carinho que você tem a me oferecer.

Às minhas sobrinhas, Daniela e Katarina, que enchem a minha vida de amor e de esperança no futuro. Que me dão motivos e esperanças para lutar por um mundo melhor.

À memória do amor incondicional da minha vó Mariinha, que sempre será o meu exemplo de força e de raça.

Ao meu amor, Bárbara, que está sempre ao meu lado e que aguenta todas as minhas crises de ansiedade e estresse. Que me acalma e me traz de volta a realidade.

Aos meus familiares por me fornecerem tanto carinho e tantos momentos de alegria. Um agradecimento especial à minha tia Raimunda, que em todos os momentos é lembrada e que me despertou a curiosidade sobre essa doença tão complexa.

Ao Totó e à Belinha, que mesmo sem saber, foram meus companheiros de escrita e meus refúgios de paz quando tudo parecia tão difícil.

À Bruna e à Carol do Laboratório Conceição Machado, a compreensão, a amizade, o incentivo e o companheirismo. Gratidão por todo o ensinamento desde a minha iniciação científica.

À Maria Carolina, pela paciência e pela prontidão para realizar a imunofluorescência e fazer o registro fotográficos das regiões de interesse.

À Eliana, por compartilhar seu conhecimento e sua experiência comigo, pelas conversas a respeito da minha insegurança acadêmica e por fazer a análise morfológica da imunohistoquímica para marcação de tirosina hidroxilase, em um momento crucial para finalização do trabalho.

Ao Cristian, amizade que a UFMG me proporcionou e que sempre foi um ponto de apoio durante as várias horas de experimento.

A orientadora Prof^a. Dr.^a Aline Silva de Miranda por me receber e aceitar me orientar mesmo com meus “poréns”, por me apoiar e ter acreditado em meu potencial.

Ao professor Hani Camille Yehia, pelo apoio e incentivo para que eu retomasse a minha caminhada e não desistisse da minha pós-graduação.

Aos meus colegas de trabalho da escola Gigante, que me receberam e cuidaram para que eu conseguisse finalizar a escrita dessa dissertação. Em especial à professora Tereza, que me acolheu e se preocupou com a minha saúde física e mental durante esse processo.

“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não aprendo
nem ensino”
Paulo Freire

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é conhecida pelos sintomas motores principalmente: tremor em repouso, bradicinesia, rigidez, instabilidade postural e festinação. Apesar de os sintomas motores serem mais conhecidos, há evidências de sintomas não motores que podem preceder em anos o aparecimento das alterações motoras. Dentre esses sintomas não motores estão alterações comportamentais e cognitivas tais como: hiposmia, depressão e ansiedade, declínio cognitivo, distúrbios do sono e constipação. Embora os mecanismos envolvidos na DP permaneçam pouco elucidados, a morte de neurônios dopaminérgicos na *Substantia Nigra pars compacta* (SNpc) e a consequente alteração da via nigroestriatal parecem desempenhar importante papel na fisiopatologia da doença. Fatores como estresse oxidativo, genética, disfunções mitocondriais, senescência, neuroinflamação e exposição às toxinas parecem ter papel importante no desenvolvimento inicial da doença. Muitos estudos descrevem a micróglia alterando sua morfologia e secretando citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) em resposta a algum gatilho inflamatório. O modelo animal por infusão intranasal de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) mimetiza aspectos do estágio inicial da doença, entretanto o papel do sistema imune na fisiopatologia desses sintomas não motores tem sido pouco explorado. No presente estudo, os animais que receberam infusão intranasal de MPTP apresentaram prejuízos significativos de memória olfatória e social bem como comportamento do tipo compulsivo e ansioso. Os sintomas não motores estão associados há um aumento da ativação glial e alterações de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos na substância negra e no estriado. Assim, o modelo de infusão intranasal por MPTP é capaz de mimetizar aspectos clínicos iniciais da DP bem como processos inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da doença. Esse modelo pode ser uma ferramenta valiosa para o estudo de mecanismos celulares e moleculares envolvidos na DP bem como para a identificação e desenvolvimento de estratégias terapêuticas com foco em minimizar ou prevenir os sintomas não motores e motores da DP.

Palavras-chave: Parkinson, MPTP, neuroinflamação, comportamento, citocinas, fatores neurotróficos.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is known for its motor symptoms: resting tremor, bradykinesia, rigidity, postural instability and festination. Although motor symptoms are better known, there is evidence of non-motor symptoms that may precede the appearance of motor alterations by years. Among these non-motor symptoms are behavioral and cognitive changes such as: hyposmia, depression and anxiety, cognitive decline, sleep disorders and constipation. Although the mechanisms involved in PD remain poorly elucidated, the death of dopaminergic neurons in Substantia Nigra pars Compacta (SNpc) and the consequent alteration of the nigrostriatal pathway seem to play an important role in the pathophysiology of the disease. Several factors have been implicated in dopaminergic degeneration such as genetics, senescence, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation and exposure to environmental toxins. Many studies describe microglia changing its morphology and secreting pro-inflammatory cytokines, neurotoxins and reactive oxygen species (ROS) in response to some inflammatory trigger. The animal model by intranasal infusion of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) mimics aspects of the early stage of the disease, however the role of the immune system in the pathophysiology of these non-motor symptoms has been little explored. In the present study, animals that received intranasal infusion of MPTP showed significant impairment of olfactory and social memory as well as compulsive and anxious-type behavior. Non-motor symptoms are associated with glial activation and changes in inflammatory mediators and neurotrophic factors in the substantia nigra and striatum. Thus, the MPTP intranasal infusion model is able to mimic early clinical aspects of PD as well as inflammatory processes involved in the pathophysiology of the disease. This model can be a valuable tool for the study of cellular and molecular mechanisms involved in PD as well as for the identification and development of therapeutic strategies focused on minimizing or preventing PD-associated non-motor and motor symptoms.

Keywords: Parkinson, MPTP, neuroinflammation, behavior, cytokines, neurotrophic factors.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP - Doença de Parkinson

SNpc - *Substantia Nigra pars compacta*

TH - Tirosina Hidroxilase

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

REM – *Rapid Eye Movement*

EEG – Eletroencefalograma

CL – Corpos de Lewy

GABA - Ácido Gama-Aminobutírico

TLR – *Toll-like Receptors*

SNC – Sistema Nervoso Central

ROs - Espécies Reativas de Oxigênio

IL – Interleucina

TNF – Fator de Necrose Tumoral

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

NGF – Fator de Crescimento Nervoso

NT – Neurotrofina

MPTP – 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina

6-OHDA – 6-hidroxidopamina

LPS - Lipopolissacarídeo

DAT – Transportador de Dopamina

i.n. - Intranasal

DA – Dopamina

NA – Noradrenalina

PFA - Paraformaldeído

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Linha do tempo da morte neuronal.....	18
Figura 2: Metabolismo do MPTP no cérebro	26
Figura 3: Esquema demonstrativo da infusão intranasal de MPTP/salina nos camundongos.....	31
Figura 4: Reconhecimento olfatório em camundongos 5 dias após infusão	41
Figura 5: Teste de reconhecimento social 6 dias após a infusão	42
Figura 6: Comportamento compulsivo após 8 dias de infusão por MPTP	43
Figura 7: Análise de teste claro-escuro no 5º dia pós-infusão i.n. de MPTP.....	44
Figura 8: Teste do labirinto em cruz elevado após 10 dias de infusão de MPTP	45
Figura 9: Os efeitos de i.n. infusão de MPTP na atividade locomotora e resposta de ansiedade em camundongos.....	46
Figura 10: Resultados representativos dos efeitos do MPTP no tempo de imobilidade no teste de nado forçado	46
Figura 11: Imunocoloração de TH representativa e análise morfométrica na SNpc dos camundongos	47
Figura 12: Coloração por imunofluorescência de Iba-1 representativa e análise da área de emissão fluorescência na SNpc	48
Figura 13: Coloração imunofluorescente GFAP representativa e análise da área de emissão fluorescência na SNpc	49
Figura 14: Efeitos de infusão i.n. de MPTP (1 mg / narina) nos níveis de citocinas noSNpc.....	50
Figura 15: Efeitos de i.n. infusão de MPTP (1 mg / narina) nos níveis de citocinas no corpo estriado.....	51
Figura 16: Razões entre as quantidades relativas de TNF / IL-10 e IFN- γ / IL-4 na SNpc e no estriado	52
Figura 17: Os efeitos de infusão de MPTP (1 mg / narina) em fatores neurotróficos da SNpc.....	53
Figura 18: Os efeitos do MPTP em fatores neurotróficos no estriado	54

SUMÁRIO

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
1.1. Aspectos Gerais da Doença de Parkinson	13
1.2 Epidemiologia da Doença de Parkinson	14
1.3 Sintomas da Doença de Parkinson	16
1.4 Fisiopatologia da Doença de Parkinson	19
1.5 Neuroinflamação e Fatores Neurotróficos na Doença de Parkinson	21
1.6 Modelos Experimentais da Doença de Parkinson	24
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	27
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo Geral	29
3.2. Objetivos Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. Animais	30
4.2. Infusão intranasal de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	30
4.3. Reconhecimento Olfatório Discriminativo	31
4.4. Teste de Reconhecimento Social	32
4.5. Marble Burying	32
4.6. Teste de claro-escuro	33
4.7. Labirinto em cruz elevado	33
4.8. Avaliação de atividade locomotora em Teste de Campo Aberto (Open Field Test)	34
4.9. Teste de nado forçado	35
4.10. Eutanásia e preparação de tecidos para análise	35
4.11. Marcação de células tirosina hidroxilase positivas por imunohistoquímica	36
4.12. Imunofluorescência com dupla marcação para Iba-1 e GFAP	37
4.13. Dosagem de fatores neurotróficos e de citocinas	38
4.14. Expressão de mRNA de receptores NGF e BDNF	39
4.15. Análises estatísticas	39
5. RESULTADOS	40
5.1. Testes Comportamentais	40
5.2. Quantificação da morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc	45
5.3. Quantificação de micróglia e astrócitos	46
5.4. Dosagem de citocinas	48
5.5. Fatores neurotróficos	53

6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	59
8. REFERÊNCIAS	60

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. Aspectos Gerais da Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP), também conhecida como paralisia agitante, é a mais comum desordem do movimento e é a segunda mais comum doença neurodegenerativa do sistema nervoso central, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer (Radhakrishnan *et al.*, 2018). A DP foi descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson em sua monografia, na qual escreveu os sintomas clínicos clássicos da doença: tremor de repouso, lentidão dos movimentos voluntários (bradicinesia), instabilidade postural e marcha festinante (Parkinson, 1817, republicado em 2002).

Em 1861, Jean-Martin Charcot caracterizou melhor os sinais clínicos da doença e sugeriu o nome de “La maladie de Parkinson”, reconhecendo James Parkinson por sua monografia. Charcot caracterizou a presença de disartria, disfagia, micrografia e alterações autonômicas; definiu a rigidez, instabilidade postural e a bradicinesia, além de propor o primeiro tratamento farmacológico da doença. Posteriormente, Frederick Henry Lewy (1912) reportou a presença de inclusões no interior dos neurônios de pacientes diagnosticados com a DP (atualmente conhecidos como corpos de Lewy, causada pelo acúmulo da proteína alfa-sinucleína). Konstantin Tretiakoff em 1919 reportou a alteração estrutural devido à morte de neurônios da substância negra *pars compacta* (SNpc) do mesencéfalo ventral (Rodríguez-Violante, 2017).

Em 1957, o trabalho de Arvid Carlsson e Oleh Hornykiewicz estabeleceu um grande marco para a DP: a deficiência da dopamina foi descrita pela primeira vez em modelo animal, e levou ao primeiro tratamento utilizando a levodopa (Jankovic e Tan, 2020), um medicamento que é convertido em dopamina no sistema nervoso central e supre a deficiência do neurotransmissor. O efeito do medicamento começa normalmente em 45 a 90 minutos após a ingestão e controla os sintomas motores dos pacientes, e seu efeito pode durar algumas horas (Picconi *et al.*, 2017). Em alguns casos, o paciente se torna resistente à medicação e pode ser indicada a estimulação cerebral profunda, feita por meio de intervenções cirúrgicas (Reich & Savitt, 2019).

Atualmente, acredita-se que os primeiros sintomas motores da DP aparecem quando cerca de 60-70% das células dopaminérgicas tirosina hidroxilase-positivas

(TH-positivas) da SN_{pc} são degeneradas (Przedborski, 2000). A SN_{pc} é uma região que envia projeções para o núcleo estriado, a chamada via nigroestriatal que desempenha papel importante no controle e modulação do movimento voluntário do corpo (Keath *et al.*, 2007).

Além dos sintomas motores, é reconhecido que os indivíduos podem apresentar uma variedade de sintomas neurológicos e psiquiátricos, incluindo a constipação, diminuição do olfato, distúrbios do sono, dor, depressão e transtornos de ansiedade que surgem anos antes de os déficits motores clássicos de PD serem aparentes (Ferrer *et al.*, 2011; Savica *et al.*, 2010). É importante ressaltar que além da via nigroestriatal, a substância negra também envia projeções para regiões que estão diretamente relacionadas envolvidas à emoção, comportamento, motivação e recompensa (Chinta & Andersen, 2005).

Diversos estudos longitudinais associam alguns fatores de risco para DP: consumo de leite e derivados (Chen *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2014), exposição à pesticidas e produtos químicos conhecidos por afetar complexo mitocondrial I ou para causar estresse oxidativo (Baldi *et al.*, 2003; Tanner *et al.*, 2011), trauma crânioencefálico (Rugbjerg *et al.*, 2008) entre outros. Já alguns estudos mostram alguns fatores que podem estar associados à redução do número de casos da DP, sendo eles: tabagismo (Chen *et al.*, 2010), consumo de cafeína (Liu *et al.*, 2012) e atividades físicas (Yang *et al.*, 2015).

1.2 Epidemiologia da Doença de Parkinson

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum que acomete a população humana, ficando atrás somente do Alzheimer (Reich & Savitt, 2019). A incidência da doença varia de forma considerável de acordo com a idade da população estudada: a porcentagem de indivíduos acometidos pela DP abaixo de 50 anos é muito baixa, mas aumenta consideravelmente e atinge seu pico aos 80 anos de idade (Ascherio & Schwarzschild, 2016) e aproximadamente 10% de todos os casos são devidos a mutações genéticas (Hindle, 2010).

Estima-se que de 15 indivíduos a cada 100.000 habitantes desenvolvam a doença por ano e a prevalência esteja entre 100 a 200 por 100.000 indivíduos na

população mundial (Tysnes *et al.*, 2017). Além disso, devido ao envelhecimento da população mundial, estima-se que o número de pacientes com DP dobre até 2030 (Elbaz *et al.*, 2016), o que levaria a uma maior carga econômica e social nos países com maior população idosa, a menos que nos próximos anos sejam desenvolvidas formas de tratamento, prevenção ou até mesmo cura para a doença (Simon, Tanner & Brundin, 2019)

De acordo com o censo 2000 do IBGE, a incidência da DP nos brasileiros é de 700/100.000 indivíduos com idade entre 60-69 anos, e de 1.500/100.000 indivíduos com idade entre 70-79 anos. Porém o número de pacientes com DP é meramente estimativo, pois não é obrigatória a notificação dos casos. Em 2016, foi estimado que 220 mil pessoas fossem acometidas pela doença (Bovolenta & Felício, 2016). Em estudo realizado em Bambuí, cidades de Minas Gerais foram pesquisadas 86 pessoas com idade acima de 64 anos e a taxa de prevalência da DP foi 3,3% (Barbosa *et al.*, 2006), o que indica que o valor estimado está muito abaixo da realidade. Nesse estudo não houve diferença estatística de incidência entre os gêneros.

Hirsch e colaboradores (2016) mostraram uma diferença significativa nas taxas de incidência de DP por gênero, entre as idades de 60-69 e 70-79 anos, sendo que os homens os principais acometidos. Do ponto de vista neurobiológico, Haaxma e colaboradores (2007) relataram que as mulheres podem exibir um fenótipo mais benigno e progressão mais lenta da doença, e especulam que esta diferença fenotípica é atribuível a uma maior atividade de estrogênio. Entretanto, algumas meta-análises identificam que algumas populações não apresentam a diferença na taxa de incidência entre os gêneros, argumentando contra o efeito protetor do hormônio sexual feminino (Taylor, Cook & Counsell, 2007).

Algumas profissões também possuem níveis de incidência da DP aumentados quando comparados com a população em geral. Simon, Tanner & Brundin (2019) relatam sobre a exposição ocupacional à pesticidas (como em trabalhadores agrícolas e moradores do campo), à solventes clorados (utilizado em limpezas, anestésicos e na produção de alguns tipos de tecido) e ao manganês (presente em equipamentos de soldagem, elevando casos de DP em soldadores).

1.3 Sintomas da Doença de Parkinson

Os núcleos da base, em especial o núcleo estriado e a SNpc são o foco principal das alterações estruturais apresentadas na DP: redução significativa na pigmentação da neuromelanina, perda neuronal e presença de CL são observadas na SNpc (Lotankar, 2017). Os primeiros sinais motores da DP aparecem quando cerca de 50% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc são degenerados (Armstrong, 2020) e resulta na diminuição da entrada da dopamina no estriado, chamada via nigroestriatal, responsável pelo controle dos movimentos voluntários do corpo (Chinta & Andersen, 2005).

Os sinais motores da DP incluem tremor em repouso, bradicinesia, instabilidade postural e rigidez. O mais comum é o tremor em repouso, que inicialmente afeta a extremidade do membro e geralmente é unilateral. A velocidade do tremor é baixa, e é suprimido pelo relaxamento total do membro (Hayes, 2019).

Apesar das alterações motoras serem a principal característica da DP, também são manifestados sintomas não motores que são tão debilitantes quanto os sintomas classicamente conhecidos. As principais alterações não-motoras descritas são: declínio cognitivo, hiposmia (perda de olfato), depressão, ansiedade, constipação e distúrbios do sono (Hayes, 2019). É importante ressaltar que além da via nigroestriatal, a substância negra também envia projeções para área tegmentar ventral, e esta via está diretamente relacionada com regiões límbicas envolvidas com emoção, comportamento, motivação e recompensa (Chinta & Andersen, 2005).

Os sintomas não-motores da DP podem anteceder por vários anos o aparecimento dos sintomas motores e definitivos para o diagnóstico da doença, e futuramente podem contribuir como marcadores para a previsão de quem irá desenvolver a patologia (Reichmann, 2017). Para isso, é necessário verificar o histórico de saúde do paciente, o que pode ser difícil pois eles próprios não podem mencioná-los aos seus médicos por não associarem a DP ou, em alguns casos, por vergonha, como relata Pfeiffer (2015).

A hiposmia é o sinal pré-motor mais comum e se desenvolve com cerca de 4 a 6 anos antes da doença se manifestar em sua forma clássica (Müller *et al.*, 2005). Segundo Mahlknecht, Seppi e Poewe (2015), “déficits de detecção, identificação ou discriminação olfatória têm sido encontrados de forma consistente em aproximadamente 80% dos pacientes com DP”. Estudos demonstraram que há

presença de CL no bulbo olfatório dos pacientes, mesmo nos que se encontram na fase pré-motora da DP (Braak *et al.*, 2004), corroborando a hipótese de que se trata de um sinal pré-clínico da doença.

A depressão e a ansiedade estão entre os sinais não-motores mais importantes da DP, e também é um importante sintoma pré-clínico (Thobois *et al.*, 2017). Sintomas depressivos estão presentes em 20 a 30% dos portadores da doença, enquanto a ansiedade possui um índice epidemiológico de 20 a 52%. Comumente esses sintomas estão relacionados a baixa qualidade de vida e baixo desempenho social dos pacientes, e necessitam de diagnóstico e tratamento (Ray & Agarwal, 2019).

Distúrbios do sono REM têm prevalência de cerca de 40% em pacientes com DP, e aparecem anos antes dos sintomas motores (Amato *et al.*, 2020). O sono REM (*Rapid eye movement*, em português: movimento rápido dos olhos) é caracterizado por apresentar os traços no eletroencefalograma (EEG) parecidos com o EEG de vigília: alta frequência e baixa voltagem das ondas detectadas. Associados às ondas cerebrais, é observado o rápido movimento dos olhos e a atonia muscular (Amato *et al.*, 2020).

Tabela 1. Sintomas motores e não motores da doença de Parkinson.

Sintoma	Definição ou elementos-chave
Motores	
Bradicinesia	Lentidão e movimentos progressivamente menores (hipocinesia) conforme um indivíduo repete uma tarefa várias vezes consecutivas
Rigidez	Resistência involuntária e independente da velocidade ao movimento passivo de uma articulação por um examinador, com ou sem um fenômeno da roda dentada
Tremor em repouso	Um tremor de 4 a 6 Hz em um membro totalmente em repouso, que desaparece temporariamente quando o membro é mantido estendido e, em seguida, retorna (tremor reemergente) e não está presente durante o movimento
Instabilidade postural	Comprometimento do equilíbrio que afeta a capacidade de uma pessoa de mudar ou manter posturas, como caminhar ou ficar em pé; tipicamente uma característica tardia da doença de Parkinson
Não-motores	
Perda olfatória	Sentido do olfato diminuído ou ausente (hiposmia)
Distúrbio do sono	Sintomas de distúrbio comportamental do sono de movimento rápido dos olhos, sonolência diurna, insônia de manutenção do sono
Alterações autonômicas	Constipação, esvaziamento gástrico retardado, urgência e frequência urinária, disfunção erétil, hipotensão ortostática, sangue, variabilidade de pressão.
Distúrbios psiquiátricos	Depressão, ansiedade, apatia e psicose.
Comprometimento cognitivo	Comprometimento cognitivo leve ou demência, muitas vezes afetando inicialmente a atenção, o executivo e funções visuoespaciais

Tabela 1 - Sintomas motores e não motores da doença de Parkinson: *resumo dos sintomas motores e não motores da doença de Parkinson (tabela adaptada de Armstrong, 2020)*

Tanto os sintomas motores quanto os não-motores sofrem flutuações durante determinados períodos da vida do paciente. Apesar disso, essas flutuações sofridas nos sintomas não-motores são os que mais reduzem a qualidade de vida do paciente e da família, e são as maiores preditoras de alocar os pacientes em casas de repouso (Pfeiffer, 2015).

Os tratamentos utilizados nos pacientes portadores da DP visam controlar exclusivamente os sintomas motores que caracterizam a doença, por meio do aumento dos níveis de dopamina disponíveis nas regiões acometidas pela neurodegeneração (Crippa *et al.*, 2014; Ferreira-Junior *et al.*, 2020). Entretanto, as alterações não-motoras não são responsivas a essa abordagem terapêutica e podem ser agravadas, comprometendo ainda mais a qualidade de vida do paciente (Rieder, 2020).

Em um estudo realizado por Braig *et al.* (2015), revelou-se que o tratamento dos sintomas não-motores é infrequente em pacientes de DP. A medicação era prescrita para apenas 28% daqueles com depressão moderada a grave, 2% dos pacientes com distúrbios do sono e 66% de indivíduos com constipação moderada. O diagnóstico anterior ao desenvolvimento dos sintomas motores também é um desafio, tendo em vista que a morte neuronal e alguns sintomas já estão presentes anos antes do aparecimento dos sintomas motores, quando a neurodegeneração já está em estágio avançado (Miller & O'Callaghan, 2016). A figura 1 demonstra uma linha do tempo entre o início da morte neuronal e o diagnóstico, como acontece atualmente.

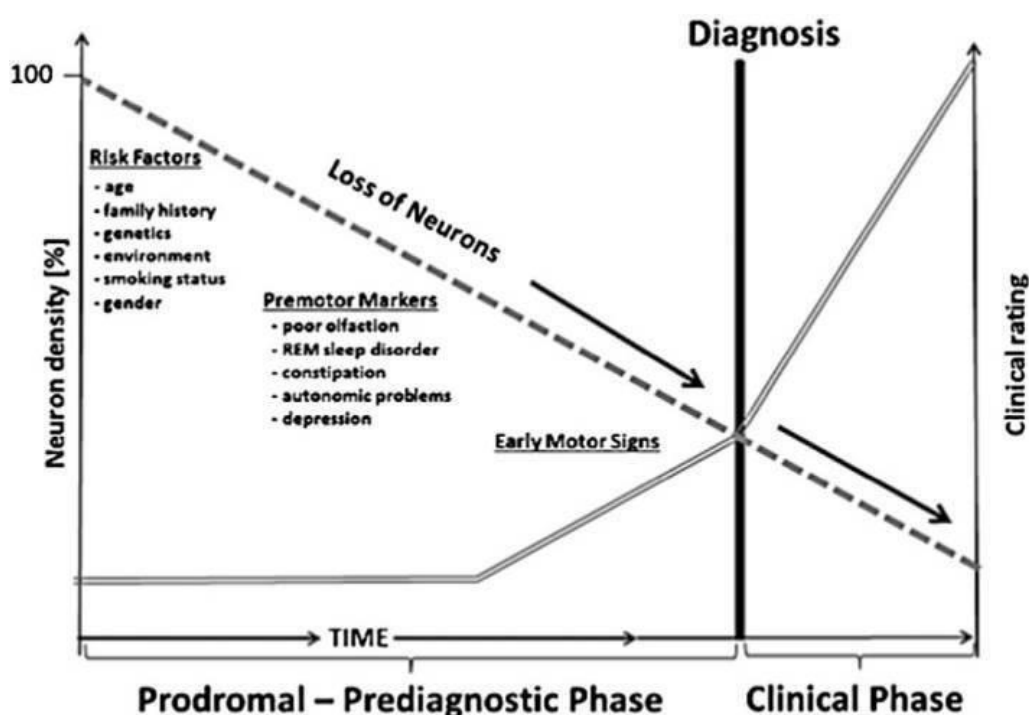


Figura 1: Linha do tempo da morte neuronal. Fatores e marcadores pré-motores associados à perda de neurônios antes do início dos sinais motores e do diagnóstico clínico. (Retirado de Miller & O'Callaghan, 2016).

1.4 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

Como citado anteriormente, a DP é conhecida pela morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Dickson, 2018), despigmentação dessa região nos indivíduos acometidos pela doença e a presença de aglomerados de proteínas dobradas incorretamente, formando o CL (Dauer & Przedborski, 2003). É uma doença progressiva e irreversível, que altera o funcionamento da via nigroestriatal, via mesocortical e mesolímbica (Chinta & Andersen, 2005; Wise, 2004).

A SNpc é uma região com intensa pigmentação proveniente do acúmulo de neuromelanina de tom escuro, sendo a região mais pigmentada do cérebro (Zucca *et al.*, 2014). A neurodegeneração na SNpc afeta principalmente o núcleo estriado, diminuindo drasticamente a dopamina na via nigroestriatal. Como explicitado por Urban *et al.* (2020), outras estruturas e neurotransmissores também são afetados: os neurônios noradrenérgicos do locus coeruleus, neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert e neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe também está envolvida com a fisiopatologia da DP. As alterações dos níveis de acetilcolina, glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) no núcleo subtalâmico, tálamo e no córtex também se relacionam com a sintomatologia clínica da desordem (Wichmann & De Long, 2003).

Além da morte neuronal, os CL são importantes marcadores histopatológicos da DP. Os CL são inclusões intracelulares de proteínas mal inoveladas, em que se destaca a alfa-sinucleína. A α -sinucleína é um componente central para a patogênese da doença. No entanto, o mecanismo pelo qual a α -sinucleína causa toxicidade e contribui para a morte neuronal permanece desconhecido (Mahul-Mellier *et al.*, 2020). Em meados da década de 1990 foi descoberta “a primeira forma monogênica de Parkinsonismo de CL, [...] mutação A53T no gene da alfa-sinucleína”, tornou a proteína um dos principais alvos das pesquisas sobre DP (Langston, 2017).

Após a descoberta da DP e sua fisiopatologia, muito se discutiu sobre a etiologia da doença. Discussões a respeito de fatores genéticos e ambientais passaram por mudanças com o passar dos anos, mas nunca se chegou a uma resposta conclusiva sobre o gatilho inicial para a neurodegeneração.

Existem diversas vertentes de estudo sobre a etiologia da doença: fatores ambientais que interagem com fatores genéticos (Rieder, 2019; Simon, Tanner & Brundin, 2019), senescência (Levy, 2007), neuroinflamação (Barcia *et al.*, 2011), exposição a toxinas ambientais (Mangano & Hayley, 2009), disfunções mitocondriais (Yang & Lu, 2009), entre outros.

Dentre os fatores ambientais, a exposição a pesticidas (como o paraquat e a rotenona) são fortemente associados a um risco para desenvolvimento da doença de Parkinson. Por outro lado, condições genéticas aumentam o risco diante da exposição dessas substâncias, não podendo se negar a importância das variantes genéticas (Chia *et al.*, 2020).

Alguns genes são estudados por possuírem relação com o desenvolvimento com a DP. Em meta-análise com a maior base de dados realizada por Nalls *et al.* (2019), foram identificados 90 fatores de risco genéticos comuns independentes que se relacionam de alguma forma com o risco de se desenvolver a doença. Como, por exemplo, mutações do gene GBA são consideradas a mutação genética mais comum até o momento identificada nesta doença. Uma hipótese é que haja redução da atividade enzimática levando ao acúmulo anormal de alfa-sinucleína e entre outras mudanças fisiológicas (Rieder, 2019).

Além disso, as mutações genéticas associadas à DP mais comuns têm penetrância incompleta, indicando que outros fatores ambientais ou genéticos estão envolvidos. Um estudo comparando as taxas de concordância em gêmeos monozigóticos e dizigóticos estimou a herdabilidade em apenas 30%, sugerindo que a maior parte do risco da DP está relacionada a fatores ambientais e comportamentais (Simon, Tanner & Brundin, 2019).

Além das descobertas de fatores genéticos associados ao desenvolvimento da DP, estudos apontam relação entre infecções virais e parkinsonismo, seja ele transitório ou permanente. Esse campo de pesquisa investiga números anormais de casos de parkinsonismo durante pandemias e epidemias de determinados vírus, sendo os mais comuns das famílias Herpesviridae, Orthomyxoviridae, Picornaviridae e Flaviviridae (Jang *et al.*, 2009; Henry *et al.*, 2010; Victorino *et al.*, 2020), e segundo Victorino *et al.* (2020, p. 900) os dados sugerem uma contribuição viral para o início da neurodegeneração da DP, seja diretamente (pela presença do vírus no parênquima cerebral) ou indiretamente (induzindo um processo inflamatório no cérebro).

Além dos fatores mencionados, estudos têm demonstrado que o envelhecimento gera uma série de mecanismos celulares e moleculares que ativam um estado chamado “*inflammaging*”, em que são ativados uma série de mediadores inflamatórios (Li *et al.*, 2020). Li *et al.* (2020) ainda apontam que a soma de estímulos endógenos e exógenos ativam receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) durante a vida, e convergem para o estado de *inflammaging*. Franceschi *et al.* (2014) sugerem uma correlação entre inflamação e doenças neurodegenerativas. Alguns autores admitem que a liberação de uma pequena quantidade de α -sinucleína, junto com esse estado de *inflammaging*, podem ativar a micróglia e gerar uma inflamação exacerbada, o que poderia ser o gatilho da DP. Ressalta-se ainda que astrócitos imunorreativos em que apresentavam inclusões de α -sinucleína, são encontrados na DP (D’Agostinho *et al.*, 2012).

Sem um consenso sobre a etiologia da doença, foi sugerido que fatores como a senescência e fatores genéticos participam da patogênese da doença, e pode agir acompanhada de um evento ambiental, como infecções virais e traumas cranioencefálicos, processos que ocorrem na fase prodrômica da DP (Victorino *et al.*, 2020), assumindo assim que a DP pode apresentar etiologia multifatorial e convergente para a morte dos neurônios dopaminérgicos da SNpc.

1.5 Neuroinflamação e Fatores Neurotróficos na Doença de Parkinson

Embora as células gliais sejam essenciais para a homeostase do sistema nervoso central (Schwartz *et al.*, 2013), existem evidências emergentes de que as disfunções microgliais e astrocíticas contribuem para a patogênese e progressão da DP (Kam *et al.*, 2020). Repetidamente a neuroinflamação é associada à neurodegeneração, porém ainda não existe consenso sobre qual é causa e qual é a consequência entre os dois (Gelders *et al.*, 2018). Dentre várias teorias sobre as causas da DP, uma delas seria que a inflamação teria um papel importante como um dos principais ativadores da morte dos neurônios dopaminérgicos, ou seja, seria o gatilho da patologia (Calabrese *et al.*, 2018).

Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias têm sido implicados como fatores etiológicos em uma variedade de doenças neurológicas (Fillit *et al.*, 1991; Mogi *et al.*, 1996). Micróglia e astrócitos são vistos como as principais fontes de citocinas e quimiocinas, que desempenham um papel nas respostas inflamatórias cerebrais

(Tansey & Romero-Ramos, 2019; Liddelow *et al.*, 2017).

A micróglia é a célula imune em maior abundância no SNC e que tem papel fundamental para a proteção do tecido nervoso. Essas células estão constantemente escaneando o microambiente, fornecendo suporte trófico para os neurônios, realizando a fagocitose de células apoptóticas e a poda sináptica quando necessário, além de produzir fatores neurotróficos, removerem substâncias tóxicas e participar do reparo neuronal (Pajares *et al.*, 2020). Diante de um cenário patológico, a micróglia desencadeia uma cascata inflamatória com expressão de *toll-like receptors* (TLRs) e produz de uma série de mediadores pró-inflamatórios. Neurônios dopaminérgicos expressam uma gama de receptores de citocinas e quimiocinas, sugerindo serem responsivos aos produtos da micróglia e contribuindo para a lesão da via nigroestriatal (Gelders *et al.*, 2018).

Em estudos envolvendo a neuromelanina presente nos neurônios da SN_{pc}, destaca-se a possibilidade de a substância ser um gatilho para a ativação das células da glia. Ela pode ser considerada um fator protetor, protegendo as células dos efeitos tóxicos de metais redox ativos, toxinas e excesso de catecolaminas citosólicas. Em contraste, quando liberada no meio extracelular pode contribuir para a ativação da neuroglia, desencadeando a neuroinflamação que caracteriza a doença de Parkinson (Zucca *et al.*, 2014). Em um estudo realizado por Guo *et al.* (2020), foi demonstrado que os exossomos contendo α -sinucleína liberada pela micróglia são totalmente capazes de induzir a agregação de proteínas nos neurônios e inibição da síntese de exossomos na microglia reduziu a transmissão da α -sinucleína no tecido cerebral, demonstrando novamente o papel central exercido pela micróglia no curso da DP.

Os astrócitos por sua vez fazem a manutenção da homeostase do microambiente cerebral absorvendo íons e neurotransmissores, fornecendo nutrientes para o crescimento e estabelecimento dos neurônios além de regular a permeabilidade da barreira hematoencefálica (Allaman *et al.*, 2011; Wilton *et al.*, 2019). Essas células promovem o aumento do número de sinapses maduras, funcionalmente mais fortes e estáveis, evidenciando sua função indutora, estabilizadora e mantenedora do SNC (Uillian *et al.*, 2001).

Alguns estudos indicam que uma lesão cerebral causada por isquemia levaria os astrócitos a se tornarem reativos com o perfil chamado de A2, removendo níveis de glutamato e K⁺, reagindo contra espécies reativas de oxigênio (ROs) e inibindo a

inflamação excessiva da micróglia, freando o dano tecidual causado por esses fatores (Joe *et al.*, 2018; Pajares *et al.*, 2020). Entretanto, na DP os astrócitos assumem perfil que se assemelham à microglia pró-inflamatória e secretam a interleucina (IL) IL1 α e o fator de necrose tumoral — alfa (TNF α). Essas células A1 perdem suas funções normais, incluindo a nutrição de neurônios (Pajares *et al.*, 2020).

Os astrócitos com esse perfil A1 liberam quimiocinas e citocinas caracterizadas por serem neurotóxicas, como o TNF α e IL1. Além disso, estudos indicam que a micróglia induz o astrócito a se tornar A1 pela secreção de IL-1 α , TNF α e C1q (Kam *et al.*, 2020). Estudos *post mortem* indicam ainda que astrócitos A1 são encontrados em cérebros de pacientes com doenças neurodegenerativas, incluindo a DP (Liddelow *et al.*, 2017). Em estudo *post mortem* realizado por Nagatsu *et al.* (2000), foram encontrados níveis aumentados de citocinas, como TNF α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6 e diminuição de neurotrofinas, como fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e fator de crescimento nervoso (NGF), nas regiões nigroestriatal e líquido cefalorraquidiano ventricular e lombar de pacientes com DP.

Os fatores neurotróficos são peptídeos essenciais para o crescimento, maturação e sobrevivência dos neurônios, permitindo que os axônios se alonguem e se estendam. Dentre eles estão, o BDNF, Neurotrofinas 3 e 4 (NT-3, NT-4) e NGF. Neste contexto, a atuação dos fatores neurotróficos vem sendo cada vez mais investigado em doenças neurodegenerativas, com a ajuda de modelos animais e estudos clínicos (Hegarty *et al.*, 2014; Tang *et al.*, 2017).

Alguns estudos mostram os fatores neurotróficos como substâncias que poderiam desempenhar papel de proteção na DP, podendo se tornar uma estratégia terapêutica. Apesar disso, os resultados ainda são divergentes e são necessários mais estudos para que seja possível entender o papel dessas proteínas na doença (Ferreira *et al.*, 2018)

A atuação dos fatores neurotróficos se dá por meio da ligação de alta afinidade com os receptores Trk: o NGF se liga ao TrkA, o BDNF se liga ao TrkB e o NT-3 se liga com mais afinidade ao TrkC, mas também pode se ligar aos receptores mencionados anteriormente (Blum & Konnerth, 2005). A ligação da neurotrofina ao receptor causa dimerização e autofosforilação de resíduos de tirosina, levando a ativação de cascatas intracelulares, nas quais têm papéis conhecidos na sobrevivência neuronal, crescimento axonal e na plasticidade sináptica (Keefe,

Sheikh & Smith, 2017).

Devido aos papéis protetores dessas proteínas, alguns estudos já estão sendo desenvolvidos a fim delas se tornarem potenciais terapias em doenças neurodegenerativas. Em cultura, o BDNF promove o crescimento de neuritos nos neurônios dopaminérgicos de pacientes (Studer *et al.*, 1996) e os protege contra as neurotoxinas 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP) e 6-hidroxidopamina (6-OHDA) (Hyman *et al.*, 1991; Spina *et al.*, 1992). Em estudo com macacos tratados com BDNF, mostraram redução da neurodegeneração e foi observado o início tardio da DP, sugerindo um efeito protetor (Allen *et al.*, 2013).

1.6 Modelos Experimentais da Doença de Parkinson

Diante da importância clínica, social e econômica da DP, modelos animais foram descritos para o estudo dessa condição. A espécie animal a ser utilizada pode variar entre primatas não humanos, roedores, peixe-zebra e drosophilas, e os modelos podem ser baseados em manipulações genéticas ou em neurotoxinas, como 6-hidroxidopamina (6-OHDA), 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP), LPS (lipopolisacarídeo), paraquat e a rotenona (Chia, Tan & Chao, 2020).

Comparados à doença humana, os modelos animais apresentam algumas inconsistências, não só em DP, mas na grande maioria dos modelos. Em DP, a topologia da degeneração e a presença de CL podem apresentar alterações, mas os modelos oferecem informações substanciais sobre o desenvolvimento da doença (Blesa *et al.*, 2012).

O modelo de 6-OHDA foi o primeiro a ser desenvolvido e é mais utilizado em ratos (Chia, Tan & Chao, 2020). Essa droga é similar à dopamina e é conhecida por sua neurotoxicidade. Nesse modelo, a substância é injetada diretamente no encéfalo dos animais e leva a morte neuronal dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH+, uma enzima que participa da conversão da dopamina no interior dos neurônios dopaminérgicos) através do aumento da disfunção mitocondrial e estresse oxidativo. Apesar de causar a neurodegeneração e mimetizar certos aspectos da DP, não são encontrados CL na histopatologia dos animais submetidos a essa neurotoxina (Salari & Bagueri, 2019).

A administração de LPS é um modelo que induz respostas inflamatórias e que é alvo de estudos em diversas doenças neurodegenerativas, variando a forma de

injeção do LPS. Em modelos de Parkinson, pode ser feita administração na substância negra, no estriado ou de forma sistêmica, pela via intraperitoneal. Ambos os modelos desencadeiam a morte neuronal na SNpc, declínio de dopamina e alteração em componentes neuroinflamatórios, porém a injeção intraperitoneal pode representar um panorama mais completo de aspectos básicos envolvidos na DP, como a relação da inflamação sistêmica e a neuroinflamação (Batista *et al.*, 2019)

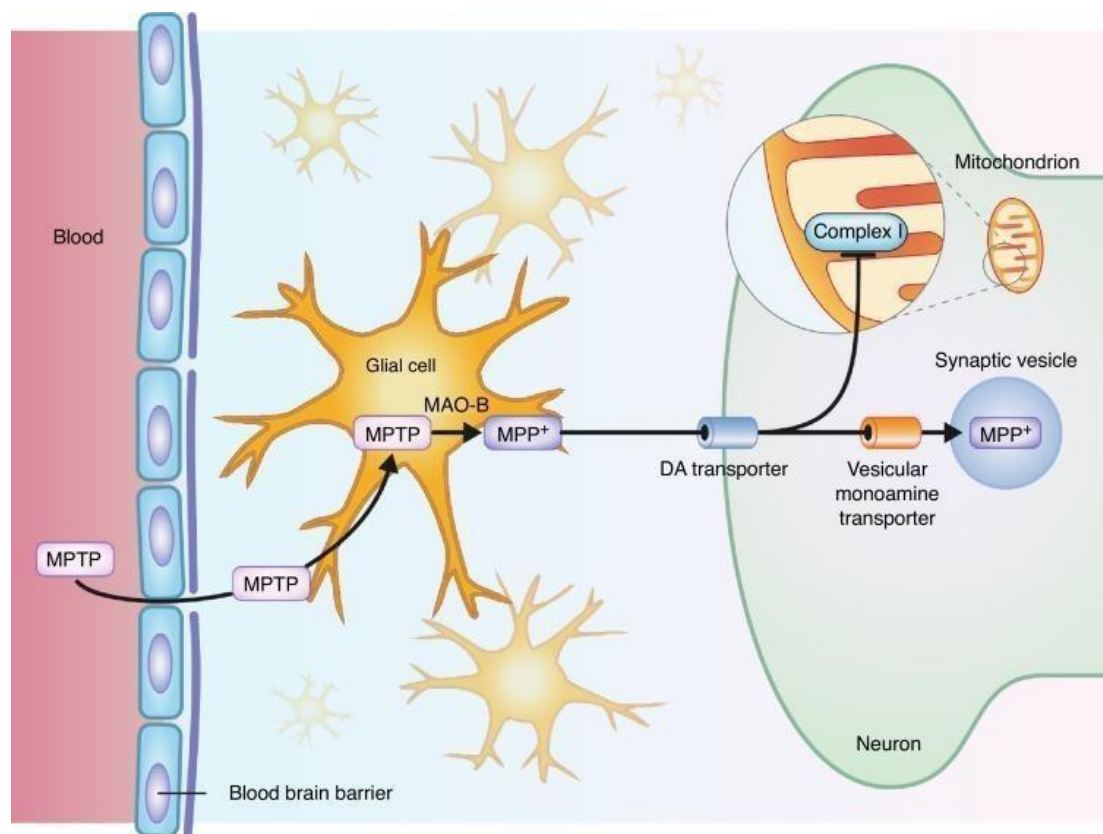
Já o paraquat e a rotenona são substâncias utilizadas como pesticidas (herbicida e inseticida, respectivamente), e a exposição a elas é considerado fator de risco para desenvolvimento da DP (Tanner *et al.*, 2011). Esses pesticidas agem no metabolismo da dopamina, o que culmina na morte dos neurônios dopaminérgicos (Qi, Miller & Voit, 2014). A rotenona provoca a formação de CL, diminui a locomoção e responde a fármacos utilizados no tratamento da DP; por sua vez, o paraquat gera perfil inflamatório leve, morte de neurônios dopaminérgicos por estresse oxidativo. Um estudo mostrou que a administração crônica de paraquat poderia ser usada para estudar o estágio pré-clínico da DP (Ossowska *et al.*, 2005).

No nosso estudo a droga utilizada foi o MPTP, uma substância que foi descrita pela primeira vez em 1983 (Langston *et al.*, 1983), quando quatro jovens desenvolveram sinais motores e não-motores da DP que tinham em comum o uso recente de uma nova “heroína sintética”. Após análises laboratoriais da equipe de Langston, eles conseguiram identificar a composição da droga em questão: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP).

Os jovens descritos por Langston além de apresentarem todas as características da DP (incluindo tremor e sinais não-motores da doença, como déficits leves na função cognitiva), todos esses pacientes tiveram resposta após administração da levodopa. Inclusive, experimentaram discinesias de levodopa idênticas à observada na DP (Langston, 2017).

O MPTP é uma molécula administrada de forma sistêmica e que penetra facilmente na barreira hematoencefálica devido à sua alta lipofilia, passando a ser metabolizada pelos astrócitos. Após ser oxidado, forma-se o íon MPP⁺ que possui grande semelhança com a molécula de dopamina. O “MPP⁺ é um metabólito tóxico que é prontamente absorvido por neurônio dopaminérgico através do transportador de dopamina (DAT)” (Chia *et al.*, 2020). Em modelos de injeção intraperitoneal de MPTP, além da perda neuronal, são induzidas alterações patológicas de alfa-sinucleína na substância negra, proteína já descrita como importante marcador da

doença (Langston, 2017), porém esse resultado não é observado na infusão intranasal do MPTP.



Drug Discovery Today; Disease Models

Figura 2: Metabolismo do MPTP no cérebro. O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e é metabolizado por MAO-B nas células gliais. Após a liberação na fenda sináptica, o MPP⁺ é captado nos neurônios dopaminérgicos por transportadores de dopamina (DAT). O efeito tóxico do MPP⁺ é a partir do bloqueio do complexo mitocondrial I, resultando em estresse oxidativo. (Retirado de Philippens, 2018).

Os eventos observados após a administração de MPTP se assemelham aos observados no estágio tardio da DP, mas os eventos do estágio inicial ainda são pouco explorados. Prediger *et al.* (2010) propuseram um novo modelo de camundongos MPTP baseado na hipótese do vetor olfativo (Doty *et al.*, 1988; Doty, 2008). Neste modelo, deficiências olfativas, cognitivas e emocionais foram observadas em um curso de tempo de 20 dias após uma única administração intranasal (i.n.) de MPTP (1mg / narina). Redução dos níveis de DA no bulbo olfatório, córtex pré-frontal e áreas estriadas; redução dos níveis de NA do bulbo olfatório e estriado; e redução da tirosina hidroxilase (TH) no bulbo olfatório, corpo estriado e SNpc também pôde ser observada (Prediger *et al.*, 2010).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A DP é uma condição neurodegenerativa na qual os mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos permanecem objeto de significativo debate. Além disso, é fundamental ressaltar que até o presente momento, não existe tratamento para os sintomas não motores da DP. As deficiências motoras da DP são muito evidentes e recebem mais atenção, no entanto, sintomas não-motores também são prevalentes e interferem diretamente na qualidade de vida do paciente, variando em gravidade de leve a incapacitante (McDonald, 2015).

O diagnóstico da doença na maioria das vezes só é realizado após o aparecimento dos sintomas motores da doença, quando a morte neuronal já está em estágio avançado. Entretanto, o início da DP já é observado antes do aparecimento desses sinais clássicos através dos sintomas não-motores, a chamada fase pré-clínica da doença. Esta fase latente de neurodegeneração na DP é de particular relevância em relação ao desenvolvimento de terapias modificadoras da doença ou neuroprotetoras que exigiriam intervenção nos estágios iniciais da doença.

Atualmente vários sinais não motores, como hiposmia e distúrbio do sono REM, foram associados a um risco aumentado de desenvolver DP em indivíduos saudáveis (Pfeiffer, 2015), portanto, um desafio chave na pesquisa em DP é identificar e validar marcadores para os estágios pré-clínicos e prodrômicos, sendo fundamental investigar modelos que mimetizem a fase inicial da doença.

O modelo subagudo descrito por Prediger *et al.* (2010) é adequado para estudar os estágios iniciais do Parkinsonismo, mas algumas características da fisiopatologia dos sintomas não-motores ainda são pouco compreendidas. Esse estudo é o primeiro a avaliar de forma ampla o processo inflamatório desencadeado nas fases iniciais após o insulto com o MPTP, e é de extrema importância que se conheça os mecanismos e as alterações morfofuncionais presentes na fase pré-motora da doença.

A este respeito, foram investigadas as alterações comportamentais assim como o perfil imunológico dos camundongos na fase inicial da doença. Foram avaliadas as citocinas pró e anti-inflamatórias no sistema nigroestriatal deste modelo

em um curso de tempo de 11 dias após a infusão de MPTP i.n.. Também avaliamos o Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), os níveis do Fator de Crescimento Nervoso (NGF) e seus respectivos receptores; e as alterações citológicas na SNpc ao estágio inicial da DP. Os resultados melhoram a caracterização deste modelo e fornece informações valiosas sobre o início da DP, contribuindo para futuras pesquisas em busca de terapias mais eficazes e para estudos em busca de um marcador da fase inicial desta doença.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar potenciais alterações motoras e processos inflamatórios relacionados à fase pré-clínica da DP em modelo de infusão intranasal de MPTP em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o surgimento dos sintomas não-motores (ansiedade, perda de olfato, depressão e compulsão) após infusão intranasal por MPTP;
- Analisar a morte de neurônios dopaminérgicos da SNpc após 11 dias do insulto por MPTP;
- Avaliar os níveis inflamatórios das regiões do estriado e da SNpc após 11 dias da administração do MPTP por meio de quantificação de astrócitos e micróglia, bem como a dosagens de citocinas.
- Avaliar possíveis variações em fatores neurotróficos e expressão de mRNA de seus receptores nas regiões envolvidas no processo degenerativo da doença (SNpc e estriado).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número 255/2017 (CEUA-UFMG)

4.1. Animais

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens com idade aproximada de 8-10 semanas, com peso entre 22-27g. Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Neurobiologia Prof. Conceição Machado por todo o período experimental, em gaiolas plásticas (41 x 31 x 16 cm) em temperatura de 21–23°C, com ciclos de iluminação de 12hs, com água e alimentação *ad libitum*.

Os animais foram divididos em dois grupos:

- Controle: no processo de infusão foi ministrado solução de salina (100 ml de água + 0,9g de NaCl).
- Experimental: foi feita a infusão de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (1mg de MPTP + 25 µL de salina).

4.2. Infusão intranasal de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina

A infusão intranasal de MPTP é o modelo utilizado para induzir a patologia nos animais, e o procedimento é realizado de acordo com a figura abaixo (fig. 3). É colocada na narina do animal uma cânula de polietileno PE-50 (Scientific Commodities Inc., EUA) conectada à microseringa Hamilton de 50 µl em bomba de infusão (Cole Parmer 74900, EUA), na taxa de 12,5 µl/min durante 2 minutos. Cada animal foi submetido à infusão duas vezes, totalizando de 2mg em volume final de 50µl.

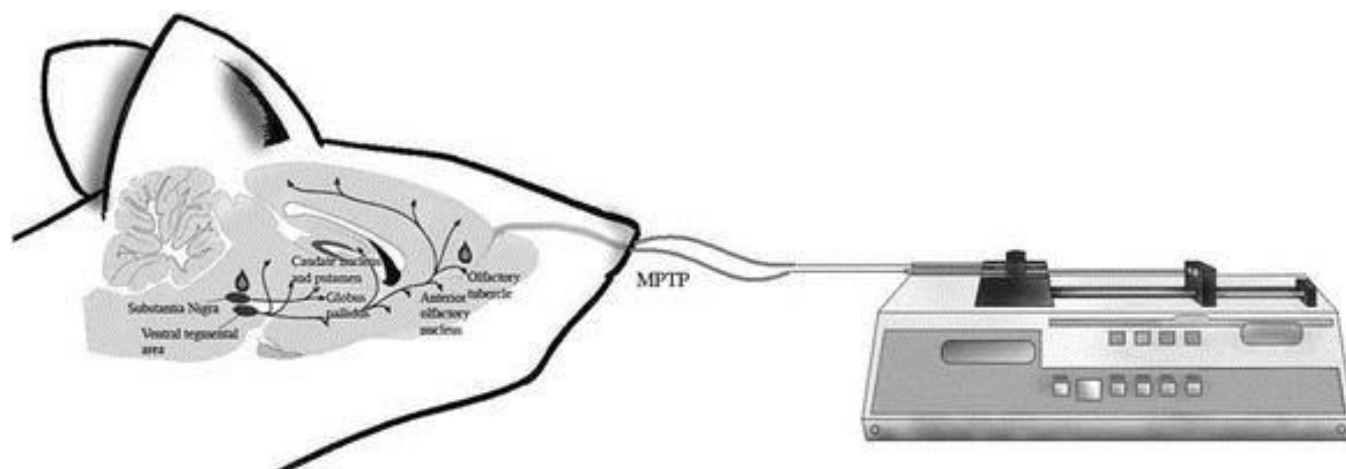


Figura 3: Esquema demonstrativo da infusão intranasal de MPTP/salina nos camundongos (retirado de Prediger *et al.*, 2010)

A administração de MPTP (1Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, Sigma-Aldrich) foi realizada por via intranasal, em duas doses de 1mg/25 μ L, uma dose por narina, sem anestesia. Estabeleceu-se o intervalo de 4 horas entre as duas doses com o objetivo de diminuir a mortalidade dos animais (Prediger *et al.*, 2010). Os animais controles receberam duas doses de solução salina estéreis, no mesmo intervalo de tempo utilizado para a administração de MPTP. A definição desse intervalo entre as duas infusões e a utilização de manta térmica após o procedimento reduz a taxa de mortalidade a quase zero.

4.3. Reconhecimento Olfatório Discriminativo

Para avaliarmos a memória olfatória do animal utilizamos o teste de reconhecimento olfatório discriminativo. O teste é baseado no fato de que os animais normalmente preferem locais impregnados pelos seus próprios odores (compartimento familiar) do que odores de outros lugares não familiares.

Foram utilizadas gaiolas plásticas padrões (41 x 31 x 16 cm) divididas igualmente em dois compartimentos separados por uma porta aberta. O animal teve a opção de escolher livremente em qual compartimento permaneceria. Em um compartimento foi colocada maravalha limpa (ambiente novo) e em outro a maravalha suja (maravalha ocupada pelo animal no mínimo por 3 dias antes do teste), ambiente familiar.

4.4. Teste de Reconhecimento Social

O teste de reconhecimento social foi realizado no 6º dia após a infusão para avaliar a sociabilidade e a memória social dos animais. Nesse teste, o animal é colocado em uma caixa com três compartimentos com aberturas que deixam a transição livre entre eles.

No primeiro momento, o animal é colocado na caixa para uma sessão treino em que explora o ambiente, não havendo nenhum outro indivíduo nos compartimentos. Após a sessão de treino, foi colocado em um dos compartimentos o desconhecido 1 e os animais testados são colocados novamente na caixa para que possam reagir diante da novidade; nesse momento, é avaliada a sociabilidade dos indivíduos. Para que seja avaliada a memória social, é introduzido um novo desconhecido e o animal novamente irá explorar a caixa; espera-se que o indivíduo testado passe mais tempo diante do desconhecido 2 por se tratar de uma novidade social.

Após o teste concluído, a análise do tempo de permanência nos compartimentos em cada situação foi feita através do software de rastreamento EthoVision (EthoVision HTP 2.1.2.0, baseado em EthoVision XT 4.1, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda).

4.5. *Marble Burying*

O teste de *marble burying* é uma ferramenta que ajuda o pesquisador a definir o comportamento repetitivo e compulsivo nos modelos estudados (Angoa-Pérez et al., 2013). Para realização do teste, foram utilizadas gaiolas plásticas com uma camada maravalha limpa e bolinhas de gude enfileiradas, em que é contabilizado a quantidade de bolinhas os animais enterram. Quanto maior o número de bolinhas enterradas, considera-se comportamento do tipo compulsivo-repetitivo.

Para realização do teste, foram utilizadas gaiolas plásticas padrões (41 x 31 x 16 cm) em que foi colocada uma camada alta de maravalha limpa e nivelada para que não ocorram variações na pontuação do teste. 25 bolinhas de gude limpas foram delicadamente colocadas sobre a maravalha, de forma a ficarem enfileiradas.

Cada animal foi colocado cuidadosamente no canto da caixa, que ficou fechada para que o animal não escapasse. Após a realização do teste, foi

contabilizado o número de bolinhas enterradas: aquelas que tiverem 2/3 de sua área total coberta por maravalha. Quanto maior o número de bolinhas enterradas, é considerado o comportamento do tipo compulsivo repetitivo.

O teste foi realizado no 8º dia após a infusão.

4.6. Teste de claro-escuro

Esse teste visa identificar o comportamento do tipo ansioso nos camundongos por meio da análise da preferência entre um ambiente claro e um ambiente escuro. De forma natural, ambientes muito iluminados representam uma ameaça devido aos seus hábitos noturnos, entretanto esses animais tendem a explorar o ambiente. Por isso, maiores tempos de permanência no lado claro da caixa são interpretados como menor comportamento do tipo ansioso (Lezak et al., 2017).

O aparelho de teste claro/escuro consiste de uma caixa de acrílico retangular contendo dois compartimentos separados. Um compartimento possui paredes pretas e um piso preto (sem iluminação) e outro possui paredes brancas e um piso branco com iluminação. Uma abertura une ambos os compartimentos, deixando livre a transição entre os ambientes.

Para realização do teste no 9º dia após a infusão por MPTP, os camundongos são colocados na parte iluminada e voltados para a abertura. O número de transições entre compartimentos e o tempo passado no lado claro da caixa foram filmados e a análise foi feita através do software de rastreamento EthoVision (EthoVision HTP 2.1.2.0, baseado em EthoVision XT 4.1, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda). Animais que tendem a entrar menos e permanecer menos tempo no ambiente iluminado são considerados com o comportamento do tipo ansioso.

4.7. Labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é usado para investigar a ansiedade em modelos animais. Para isso, o labirinto fica a 50 cm do solo, que possui dois braços abertos (50 cm x 10 cm) e dois braços fechados (50 cm x 10 cm x 40 cm), além de uma plataforma central onde são colocados os animais para o início do experimento. A pontuação total de entradas, a porcentagem de entradas e o tempo gasto em cada braço são avaliados para determinar os índices de comportamento

semelhante à ansiedade. O teste foi realizado no 10º pós-infusão e a análise foi feita através do software de rastreamento EthoVision (EthoVision HTP 2.1.2.0, baseado em EthoVision XT 4.1, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda).

Embora o teste do labirinto em cruz elevado, o teste claro/escuro e o teste de campo aberto sejam usados para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade, estudos indicam que esses testes avaliam diferentes aspectos do comportamento semelhante à ansiedade (Komada, Takao & Miyakawa, 2008). Assim, tanto o teste de transição claro / escuro, o teste de campo aberto e o teste do labirinto em cruz elevado são importantes para avaliar as diferentes facetas do comportamento dos camundongos.

4.8. Avaliação de atividade locomotora em Teste de Campo Aberto (Open Field Test)

O teste de Campo Aberto é um teste comportamental utilizado em estudos experimentais para investigar atividade locomotora e exploratória bem como níveis de ansiedade dos camundongos. É um método válido e amplamente empregado na avaliação de parâmetros comportamentais em modelos experimentais de diversas doenças humanas (Takahashi et al., 2006).

Para aquisição dos dados do teste foram utilizadas 4 gaiolas do sistema Phenotyper Noldus, com paredes opacas (30 cm X 30 cm) em que foram criadas zonas de centro e borda pelo software EthoVision XT acoplado ao sistema. Cada gaiola continha uma unidade superior com Câmera digital e luz infravermelha, permitindo a análise da locomoção de 4 camundongos simultaneamente, um em cada gaiola.

No 11º dia após tratamento com o MPTP, os animais foram submetidos ao teste que consiste em colocar cada animal no centro da arena para observação de sua locomoção livre. Parâmetros como atividade de locomoção, número de entradas no centro da arena e porcentagem de tempo gasto neste local (medida da ansiedade) foram registrados pelo software.

A locomoção ou atividade locomotora dos animais é definida pela distância total percorrida (cm) durante o tempo do teste (dez minutos) e a medida da ansiedade foi a porcentagem de entradas e de tempo gasto no centro da arena (tempo ou entradas no centro da arena/tempo ou entradas no centro e na periferia

da arena X 100), sendo que baixas porcentagens indicam maiores níveis de ansiedade.

4.9. Teste de nado forçado

Este teste é realizado para a detecção de comportamentos do tipo depressivo. O teste é com base na análise do movimento do animal como tentativa de “escapar” da situação de afogamento e os animais com maiores tempos de imobilidade são considerados com comportamento do tipo depressivo.

No 11º dia após a infusão de MPTP, o nado forçado foi realizado a fim de mapear o comportamento depressivo dos animais. No teste do nado forçado os animais são colocados individualmente em um recipiente de vidro transparente preenchido com 10 cm de água com temperatura de 23-25°C. A sessão tem duração total de 6 minutos, sendo os primeiros 2 minutos de pré-teste seguidos pelo teste de 4 min.

O tempo de imobilidade é registrado e foi posteriormente analisado por um software de rastreamento EthoVision (EthoVision HTP 2.1.2.0, baseado em EthoVision XT 4.1, Noldus Information Technology, Wageningen, Holanda), que considera o animal como imóvel quando sua velocidade se encontra abaixo de 5 cm/s.

4.10. Eutanásia e preparação de tecidos para análise

Após o término dos testes comportamentais do 11º dia após a infusão, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), e em seguida realizada o preparo dos tecidos para as análises posteriores.

Alguns animais foram submetidos à retirada de tecidos a fresco para CBA e Elisa. Para isso, foram decapitados e feita uma craniotomia para a separação das regiões de interesse: estriado e substância negra. Os tecidos são armazenados em recipiente estéril e em seguida são estocados em freezers com temperatura de -80 °C.

Para análise histológica foi realizada perfusão intracardíaca, sendo feita toracotomia para exposição da cavidade torácica e visualização do coração. Foi inserida uma agulha hipodérmica conectada a um sistema de perfusão no ventrículo

direito, permitindo a troca do sangue por uma solução salina 0,9%. Após a perfusão de cerca de 30 mL de salina, os animais são perfundidos com aproximadamente 30mL de solução de paraformaldeído 4% (PFA – pH 7,4).

Após a perfusão, os animais são decapitados e seus encéfalos foram retirados para os processos de pós-fixação, crioproteção e congelamento. O processo de pós-fixação consiste na estocagem dos encéfalos em solução de PFA 4% durante a noite. Posteriormente, os cérebros foram colocados em solução de sacarose 30% para desidratação das células, até a saturação, promovendo então uma crioproteção e estocados em freezer de -80°C.

Para o preparo dos cortes histológicos, os cérebros são cortados em um criostato (Leica) a -20 °C na espessura de 30 µm e os cortes são armazenados em solução anticongelante (etilenoglicol 24%; glicerol 24%; NaH₂PO₄ 0,1256%; Na₂HPO₄ 0,436% diluídos em PBS) a - 20 °C.

4.11. Marcação de células tirosina hidroxilase positivas por imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica é utilizada para marcar biomoléculas específicas de populações celulares, como é o caso da enzima tirosina hidroxilase. Essa enzima está presente em células dopaminérgicas pois participa da síntese desse neurotransmissor, convertendo tirosina em DOPA (Dunkley & Dickson, 2019).

Os primeiros sintomas da DP aparecem quando cerca de 60-70% das células dopaminérgicas tirosina hidroxilase-positivas (TH-positivas) da SNpc são degeneradas (Armstrong, 2020). Por isso, é importante a quantificação da morte neuronal no modelo da fase pré-clínica da doença.

No processo de marcação dessas células, cortes de SN de 30 µm são lavados 3 vezes com TBS, incubados com tampão citrato (pH 6,0) durante 1 hora, lavados novamente com TBS, incubados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% durante 15 minutos, para bloqueio da peroxidase endógena, e incubados com solução de bloqueio (BSA 4% e 0,5% de Triton-X 100 em TBS) durante 1 hora.

Em seguida, os cortes são incubados a 4°C com o anticorpo primário anti-TH (1:500) durante 72 horas, lavados 3 vezes com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (1:500 - 51 Vector) durante a noite. Depois de lavados com TBS, os cortes são incubados com o complexo Avidina-Biotina (Vector)

durante 1 hora, lavados novamente e revelados com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em H₂O₂.

Os cortes são montados em lâminas e em seguida passam por um processo de diafanização, no qual ficam imersos em sequência em soluções de álcool 70%, 80% e 95% durante 3 minutos cada, álcool 100% 2 vezes, durante 4 minutos cada e xileno 2 vezes, durante 5 minutos. Foram utilizados 4 cortes por animal, observados no microscópio LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 20 vezes e registradas as micrografias (4 campos / corte). A quantificação de células marcadas foi realizada pelo software ImageJ 1.52a, e feita a densitometria de células marcadas por campo.

4.12. Imunofluorescência com dupla marcação para Iba-1 e GFAP

A técnica de imunofluorescência é utilizada para marcar células específicas em um tecido para que seja feita a comparação entre grupo controle e o grupo experimental. Para analisar as células da glia relacionadas à neuroinflamação discutida anteriormente, será feita imunofluorescência com dupla marcação para Iba-1 e GFAP, marcando micróglia e os astrócitos. Para isso serão utilizados os anticorpos primários anti-Iba-1 *in rabbit* (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*; 1:500 — Wako) e o GFAP *in mouse* (concentração de 1:800), respectivamente.

Para a técnica de imunofluorescência, cortes de SN de 30 µm foram lavados 3 vezes com tampão tris em salina (TBS) para retirada da solução anticongelante na qual ficam estocados e são incubados com tampão citrato (pH7,6) durante 1 hora para recuperação antigênica. Os cortes são novamente lavados 3 vezes com TBS e incubados com solução de bloqueio (4% de albumina bovina sérica — BSA e 0,5% de Triton-X 100 em TBS) para bloqueio dos sítios inespecíficos durante 1 hora.

Em seguida, os cortes são incubados a 4 °C com o anticorpo primário anti-Iba-1 *in rabbit* (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*; 1:500 — Wako) e o GFAP *in mouse* (concentração de 1:800) durante 48 horas, lavados 3 vezes com TBS e incubados com o anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor 594 (1:1000 - Life Technologies) e anti-camundongo Alexa Fluor 488 (1:1000 — Life Technologies) durante 2 horas. Posteriormente, os cortes são lavados 4 vezes com TBS, incubados com DAPI 1,75 µg/mL (1:1000) durante 20 minutos e lavados com TBS por mais 4 vezes.

Foram utilizados 4 cortes por animal e observados no microscópio LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha) no aumento de 20X, e com o auxílio de uma câmera digital acoplada ao microscópio foram registradas as micrografias. A quantificação de células marcadas é realizada pelo software ImageJ 1.52a e os resultados são representados como a área de fluorescência por campo (2 campos / corte).

4.13. Dosagem de fatores neurotróficos e de citocinas

Os Kits de CBA TH1/TH2/TH7 obtidos da BD Biosciences para a quantificação de citocinas e a leitura foi feita no instrumento FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Já para a quantificação de fatores neurotróficos foram utilizados os Kits de ELISA obtidos da R&D Systems (DuoSet), e a concentração determinada por leitura em espectrofotômetro (Spectramax 190) no comprimento de onda de 450 nm.

Para dosagem é feita a obtenção do homogenato dos tecidos retirados a fresco dos animais e as amostras são pesadas (100 mg) e colocadas em 1,0 mL de solução inibidora de proteases para extração de citocinas [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina], preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89 g diluídos em 1 litro).

Posteriormente, as amostras são maceradas por um homogenizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) a uma velocidade ótima e a solução resultante é centrifugada a 10.000 r.p.m, a 4 °C, por 10 minutos (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, EUA). O sobrenadante é recolhido, aliquotado e estocado a -80°C até a sua utilização para detecção da concentração dos mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos por meio, respectivamente, das técnicas de CBA (Cytometric Bead Array) e ELISA (Ensaio imunoenzimático: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

A concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A TNF- α e IFN- γ no tecido cerebral é analisada por meio do método CBA (Cytometric Bead Array). A concentração dos fatores neurotróficos BDNF e NGF no tecido cerebral é analisada pelo método ELISA.

4.14. Expressão de mRNA de receptores NGF e BDNF

A expressão de mRNA de TrkA e TrkB na SN e estriado foram estimados em reais PCR quantitativo de tempo (reação em cadeia da polimerase) em camundongos do grupo MPTP e camundongos do grupo de controle (n = 4 camundongos por grupo). O RNA total foi extraído usando reagente TRIzol® de acordo com o protocolo do fabricante (SigmaAldrich, St. Louis, EUA). A transcrição reversa foi realizada usando 2 µg de RNA total, 200 U reverso transcriptase, tampão 5X RT (4 µl), dNTPs 10 mM (1 µl), 10.000 U RNaseOUT (0,2 µl) e 50 µM oligodT15(1,0

µl) em um volume de reação final de 20 µl. O cDNA resultante foi usado para qPCR. qPCR foi realizada em um sistema de detecção de sequência StepOne (Applied Biosystems) usando o iTaq Universal SYBR Green Supermix (produzido por Biorad). Os resultados foram expressos pela comparação entre os grupos estudados.

4.15. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prisma 8.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os resultados foram analisados quanto à distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio do teste estatístico t-student (duas variáveis). No caso de distribuição não normal, as variáveis foram comparadas por meio do teste estatístico Mann-Whitney U (duas variáveis). O nível de significância estabelecido foi $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1. Testes Comportamentais

5.1.1. Reconhecimento Olfatório

O teste de reconhecimento olfatório foi usado para avaliar os efeitos agudos do MPTP na discriminação olfativa no 5º dia pós-infusão. Na figura 4, o gráfico representa o tempo em segundos que os animais gastaram explorando ambos os compartimentos. Os camundongos do grupo controle permaneceram mais tempo no compartimento com a maravalha já ocupada por ele (ambiente familiar) do que no compartimento com a maravalha limpa (ambiente não familiar) ($p = 0,03$), demonstrando uma distinção entre os locais. Já nos animais tratados com MPTP, não foi observada preferência entre os compartimentos ($p = 0,395$). A observação deste resultado nos permite inferir que animais tratados com MPTP têm uma menor capacidade de distinção via olfato já no 5º dia após infusão i.n., já indicando hiposmia relatada como um sintoma pré-clínico de DP.

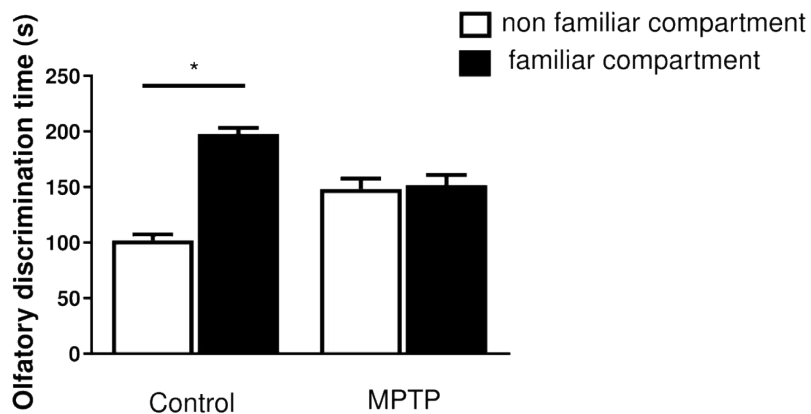


Figura 1: Reconhecimento olfatório em camundongos 5 dias após i.n. infusão com solução salina ou MPTP. Os camundongos tratados com MPTP permaneceram tempo semelhante nos compartimentos familiar e no não familiar (* $p = 0,0303$, $n = 5$ por grupo).

5.1.2. Reconhecimento Social

No teste de reconhecimento social, os animais são colocados no aparato para que eles pudessem explorar o ambiente vazio, e ambos os grupos permaneceram tempos semelhantes em ambas as câmaras (Fig. 5.A).

Após a sessão de teste, um camundongo desconhecido é introduzido em uma das

câmaras do equipamento, e os grupos de camundongos tiveram comportamento semelhante: os animais controle e os tratados com MPTP passaram significativamente mais tempo na câmara com o estranho 1 (S1) do que na câmara vazia ($p = 0,0079$ e $p < 0,0001$ respectivamente), exibindo um comportamento de sociabilidade, característica comum a essa espécie (Fig. 5.B.).

A preferência por novidades sociais foi analisada através da introdução de um segundo animal estranho (S2) no teste. Animais do grupo controle passaram significativamente mais tempo na câmara com o S2 do que na câmara com o camundongo S1 ($p = 0,0372$), em contraste com o grupo tratado com MPTP, que não apresentou diferença entre o tempo gasto na câmara com o S2 e o tempo de permanência na câmara com S1, $p = 0,3624$ (Fig. 5.C).

Essas observações refletem uma diminuição na consolidação da memória social em animais tratado com MPTP no 6º dia após a infusão de MPTP. Por outro lado, este resultado pode apresentar a perda olfativa, já que esses animais utilizam o olfato para se socializar e a hiposmia já havia sido relatada na figura 4.

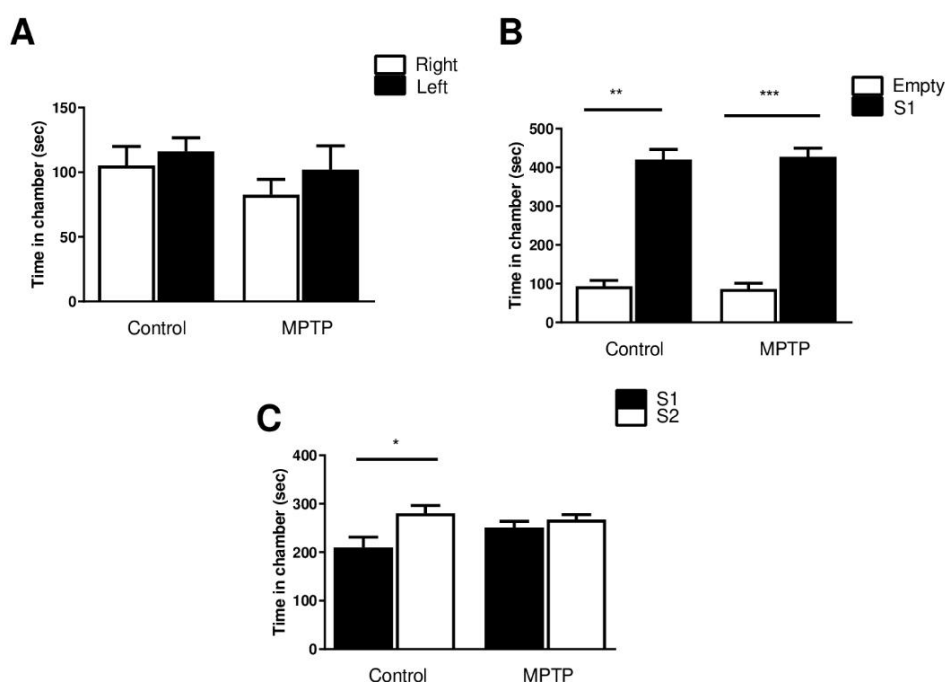


Figura 2: Teste de reconhecimento social 6 dias após a infusão em camundongos. A Fig 5.A representa a sessão de treinamento. Foram quantificados o tempo de exploração de cada ambiente para analisar a sociabilidade dos grupos. A figura 5.B representa o tempo de permanência na câmara com um camundongo novo em relação a câmara vazia; já a figura 5.C a análise feita representa a preferência por um novo estranho (S2) versus o primeiro camundongo desconhecido (S1). Os dados mostrados representam o tempo em segundos gastos em cada câmara. $n = 5$ para cada grupo. * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$, *** $P < 0,0005$.

5.1.3. Marble Burying

Em seguida, examinamos se o tratamento com MPTP induz comportamento compulsivo por através do teste *marble burying*. Na Figura 6, o gráfico representa a média de mármore enterrados na cama de aparas de madeira. Os animais de controle têm uma média estatisticamente inferior quando em comparação com o grupo tratado ($p = 0,0115$), e a análise permite concluir que os animais tratados com MPTP apresentam comportamento compulsivo, devido ao maior impulso de enterrar as bolinhas de gude.

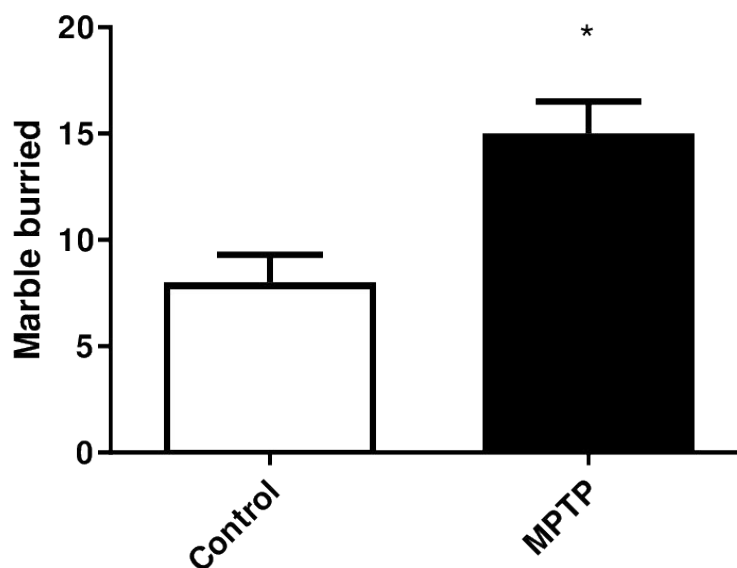


Figura 3: Comportamento compulsivo após 8 dias de infusão por MPTP. Os gráficos de barras mostram o número total de bolinhas de gude enterradas durante um julgamento. O gráfico indica um aumento significativo de bolinhas enterradas no grupo tratado por MPTP em comparação com camundongos no grupo controle (* $p < 0,05$, $n = 5$ por grupo).

5.1.4. Claro-escuro e Labirinto em Cruz Elevada

O teste claro-escuro no 9º dia após a infusão é baseado na aversão do roedor a áreas claras e foi usado para avaliar o comportamento do tipo ansiedade. Não houve diferença estatística entre o tempo gasto no ambiente iluminado (Fig. 7.a, $p > 0,999$) e nenhuma diferença foi encontrada no índice de transição entre os ambientes (Fig. 7.b, $p = 0,161$) entre o grupo controle e o grupo tratado com MPTP. Os resultados do teste de transição claro / escuro mostra que os grupos de camundongos exibiram tempos de exploração semelhantes, não exibindo comportamento do tipo ansioso.

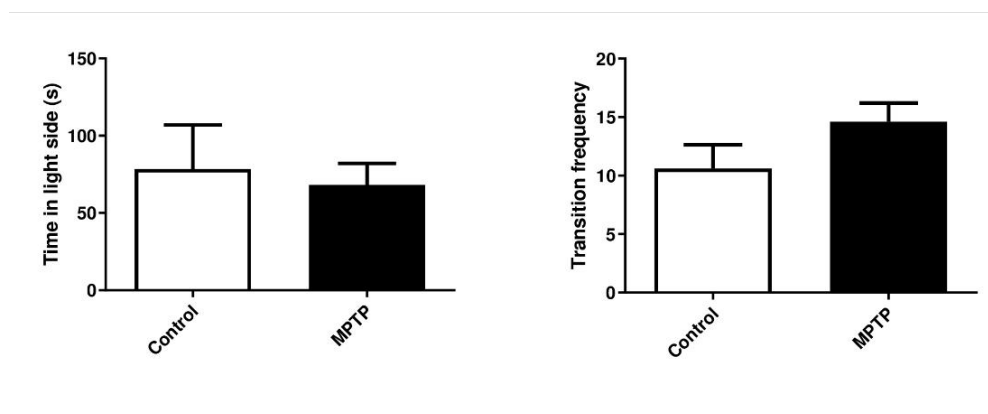


Figura 4: Análise de teste claro-escuro no 5º dia pós-infusão i.n. de MPTP. Os gráficos representam o tempo gasto no ambiente iluminado (Fig. 7.a) e o índice de transição entre os ambientes (Fig. 7.b). Não houve diferenças estatísticas de tempo gasto no ambiente iluminado entre os grupos ($p > 0,999$, $n = 5$).

No teste de labirinto em cruz elevado realizado 10º dia pós infusão, os animais em ambos os grupos não tiveram diferenças em o tempo (Fig. 8.A, $p = 0,564$), porcentagem de entradas (Fig. 8.B, $p = 0,955$) e o número total de entradas (Fig. 8.C, $p = 0,878$) no braço aberto. A análise desses resultados mostra que os camundongos não demonstraram comportamento semelhante à ansiedade neste teste.

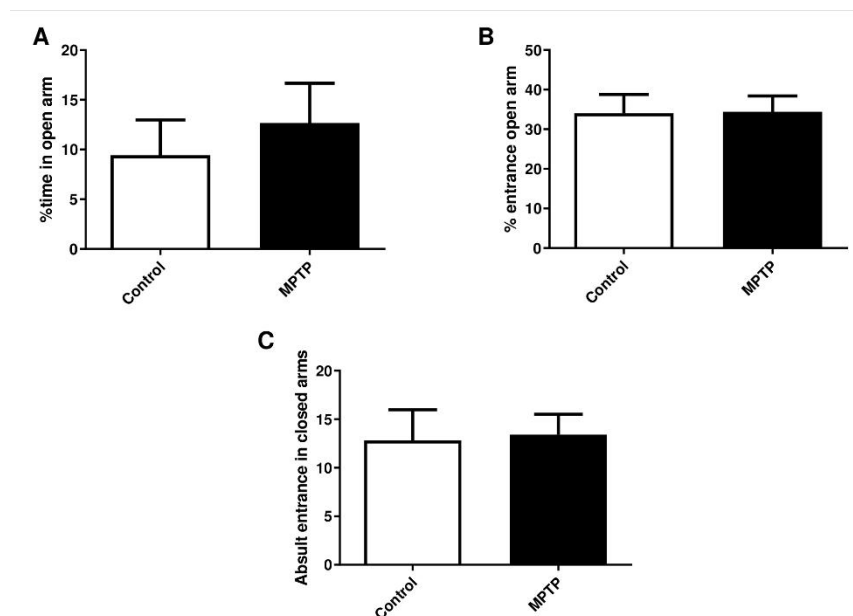


Figura 5: Teste do labirinto em cruz elevado após 10 dias de infusão de MPTP. Os gráficos de barras mostram a porcentagem de tempo gasto no braço aberto (fig. 8.A, $p = 0,564$), porcentagem de entradas de braço aberto (fig. 8.B, $p = 0,955$), e total de entradas de braço fechado (fig. 8.C, $p = 0,878$) durante o ensaio. Não houve diferenças estatísticas entre o grupo tratado com MPTP e os camundongos do grupo controle ($n = 5$).

5.1.5. Campo Aberto

A figura 9.A mostra a distância total percorrida por camundongos avaliada 11 dias após a infusão por MPTP em arena de teste de campo aberto (n = 8 animais / grupo). Nenhuma diferença significativa (p = 0,679) foi observada na distância percorrida por camundongos tratados com MPTP em comparação com o grupo controle, indicando que os sintomas dos motores ainda não apareceram e o modelo, com 11 dias após o insulto do MPTP, é pré-clínico.

A redução significativa em % de tempo no centro da arena de teste foi observada (fig. 9.B, p = 0,047), indicando um comportamento do tipo ansioso no grupo tratado com MPTP em comparação com o grupo tratado com solução salina.

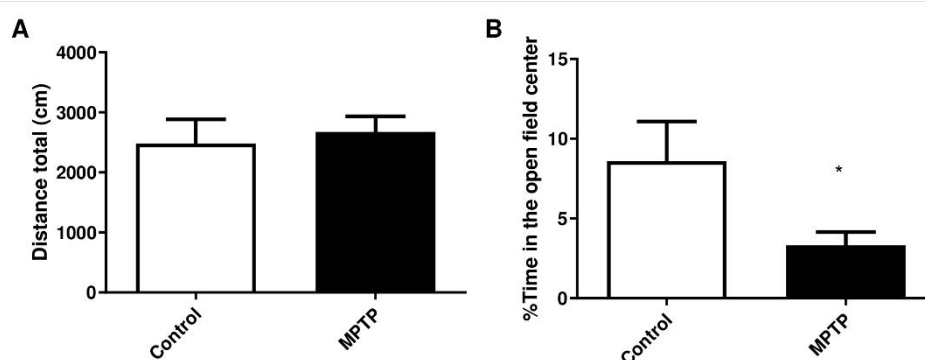


Figura 6: Os efeitos de i.n. infusão de MPTP na atividade locomotora e resposta de ansiedade em camundongos (n = 8 animais / grupo). Os animais foram testados conforme descrito nos métodos. Os dados são expressos como a média \pm S.E.M. da (A) distância percorrida (cm) e (B) % do tempo no centro, * p = 0,047 comparado ao grupo tratado com solução salina.

5.1.6. Nado Forçado

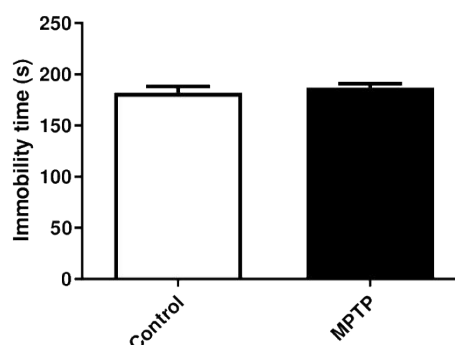


Figura 7: Resultados representativos dos efeitos do MPTP no tempo de imobilidade no teste de nado forçado. Não há diferença estatística no tempo de imobilidade entre os grupos (p = 0,505, n = 8 por grupo).

A Figura 10 representa os resultados do teste de nado forçado, utilizado para mapear a prevalência de comportamento do tipo depressivo nos animais. O gráfico representa o tempo em segundos que os animais permaneceram imóveis na caixa d'água, e podemos observar que não houve diferença estatística entre o grupo controle e o grupo tratado com MPTP ($p = 0,505$). Esse resultado indica que após 11 dias de infusão por MPTP não é constatado o comportamento do tipo depressivo nos animais.

5.2. Quantificação da morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc

A tirosina hidroxilase (TH) é uma enzima que participa da biossíntese de dopamina, portanto, sua expressão é proporcional ao conteúdo de neurônios dopaminérgicos na análise histoquímica. Na figura 11, podemos observar a marcação TH da SNpc em camundongos de controle (Fig. 11.A) e em camundongos tratados com MPTP (Fig. 11.B) no 11º após insulto de MPTP. Assim, examinamos a área (Fig. 11.C) e a densidade óptica em pixels (Fig 11.D) de imunocoloração de TH no SNpc dos grupos de controle e de tratamento com MPTP.

A análise realizada nos permite observar uma área menor, bem como uma menor densidade óptica, da marcação de TH na região SNpc dos animais tratados com MPTP quando comparado ao grupo controle ($p = 0,04$ para ambas as análises; $n = 4$ por grupo). Os valores observados mostram que a morte neuronal de neurônios dopaminérgicos já está em andamento no grupo tratado com MPTP.

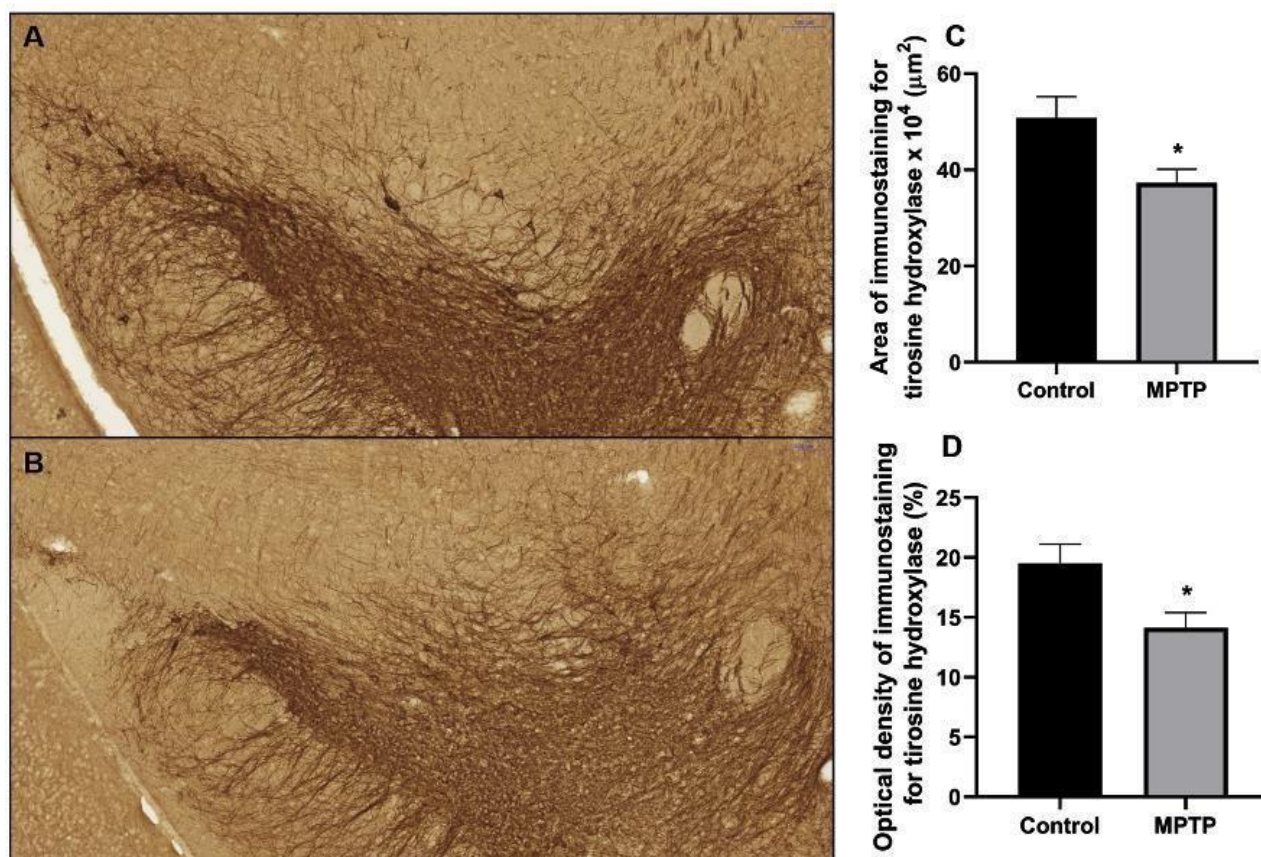


Figura 11: Imunocoloração de TH representativa e análise morfométrica na substância negra do grupo controle do tratamento MPTP. Reação de imunohistoquímica para a detecção de TH expressão revelou imunocoloração neuronal e fibrilar na substância negra de camundongos controle (A) e camundongos MPTP (B) (barras de escala = 100 μm). Usando morfometria digital, demonstramos que o grupo controle teve maior área (C) e densidade óptica de pixels (D) de imunocoloração TH ($p = 0,04$ para ambas as análises; $n = 4$ por grupo).

5.3. Quantificação de micróglia e astrócitos

Para determinar o efeito do insulto MPTP na migração de células envolvidas com a neuroinflamação no SN 11 dias após o início dos experimentos, a coloração imunofluorescente foi realizada para Iba-1 e GFAP. Iba-1 é altamente expresso em microglia, enquanto GFAP é expresso em astrócitos.

Na figura 12, podemos ver a marcação por Iba-1 na SN de camundongos de controle (Fig. 12.A) e de camundongos tratados por MPTP (Fig. 12.B). Examinamos a área de emissão fluorescência (Fig. 12.C), o que indicou que no grupo MPTP a emissão de fluorescência mostrou um aumento significativo quando comparado ao grupo de controle ($p < 0,0001$, $n = 4$ por grupo).

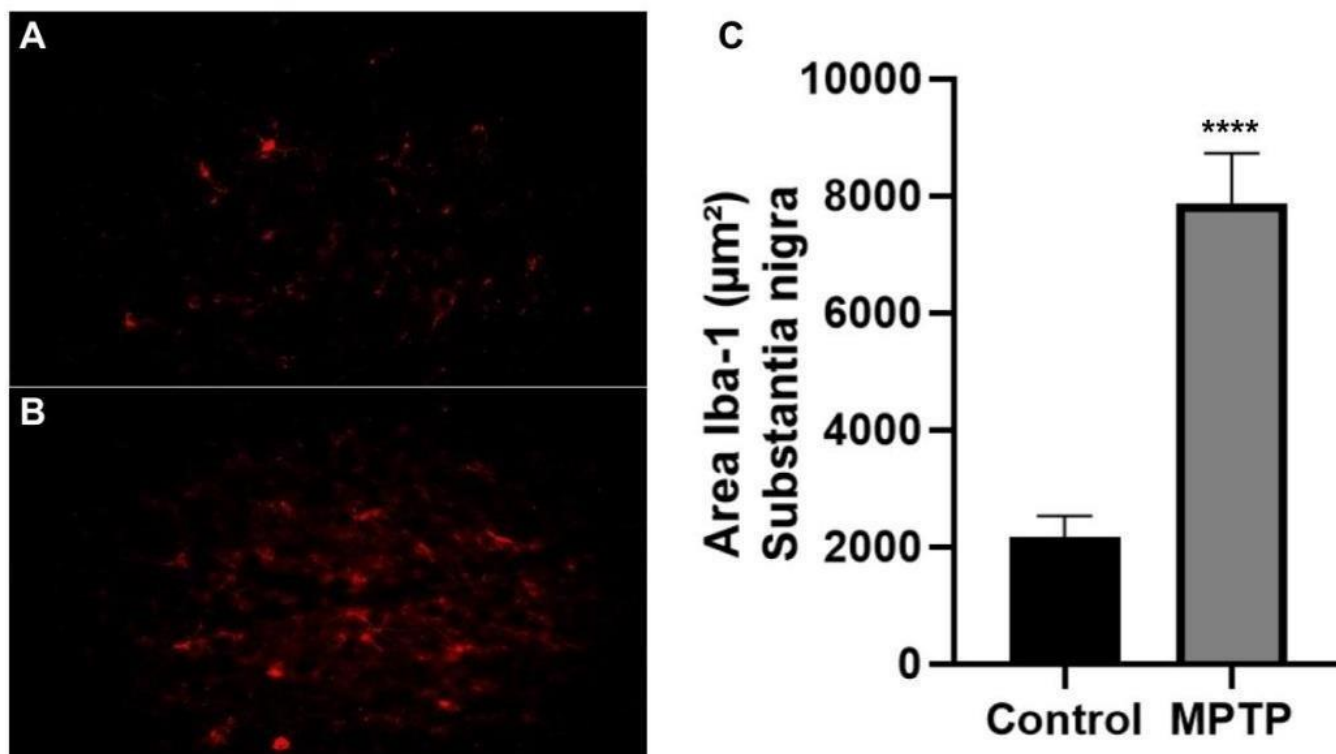


Figura 12: Coloração por imunofluorescência de Iba-1 representativa e análise da área de emissão fluorescência na SN dos grupos controle e o grupo tratado por MPTP. A análise da expressão de Iba-1 revelou a microglia na substância nigra dos animais controle (fig. 12.A) e MPTP (fig 12.B) (barras de escala = 100 µm). Usando morfometria digital, demonstramos que camundongos MPTP tinham área maior (fig. 12.C) para imunocoloração Iba-1 do que camundongos de controle (**** $P < 0,0001$; $n = 4$ por grupo)

Além disso, a análise da área marcada por GFAP em camundongos controle (fig 13.A) e em camundongos tratados com MPTP (fig. 13.B) mostra um aumento na área de fluorescência (fig. 13.C) no grupo que sofreu o insulto por MPTP ($p < 0,0001$, $n = 4$ por grupo). Assim, podemos indicar o aumento da neuroinflamação e da migração da glia células ao SN de animais que sofreram administração de MPTP.

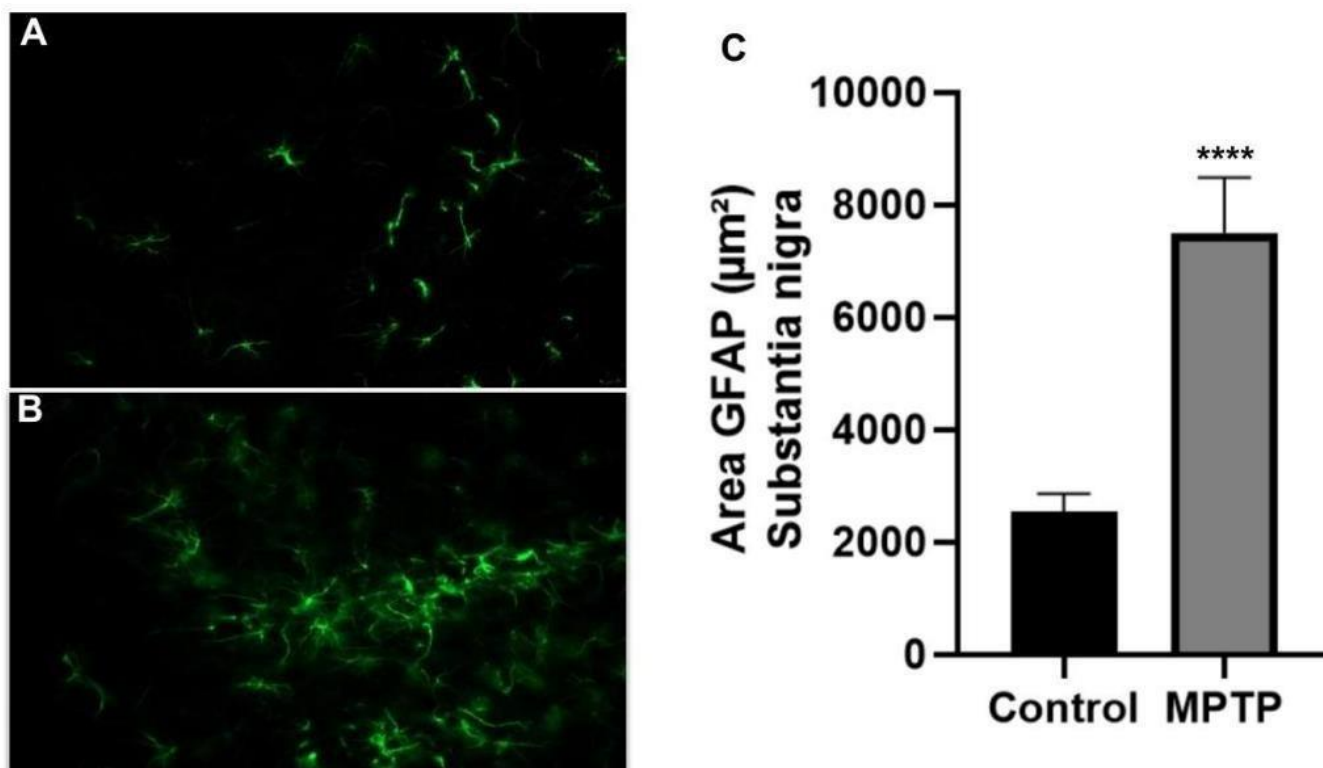


Figura 13: Coloração imunofluorescente GFAP representativa e análise da área de emissão fluorescência na SN de grupos de controle e de tratamento com MPTP. Coloração para o a detecção da expressão de GFAP revelou astrócitos do grupo controle (fig. 13.A) e MPTP (fig. 13.B) (barras de escala = 100 µm). Usando morfometria digital, demonstramos que os camundongos tratados por MPTP tinham área (C) maior para a imunocoloração de GFAP do que os camundongos de controle (**** $P < 0,0001$; $n = 4$ por grupo).

5.4. Dosagem de citocinas

Tendo em vista as alterações do número de células gliais na SN dos animais testados, a análise de citocinas torna-se relevante para se entender o perfil inflamatório da via nigroestriatal.

A figura 14 e a figura 15 mostram os níveis de citocinas (pg / 100 mg de tecido) no SN e no estriado dos camundongos, respectivamente. No SN (fig.14), um aumento significativo de IL-10 e IL-17 pode ser observado no grupo tratado com MPTP em comparação com o controle ($p = 0,0143$ e $p = 0,0353$, respectivamente). No estriado (fig. 15), IL-17 apresentou uma diferença significativa em comparação com controle ($p = 0,0411$). Nenhuma diferença significativa nos outros níveis de citocinas foi observada em ambas as áreas.

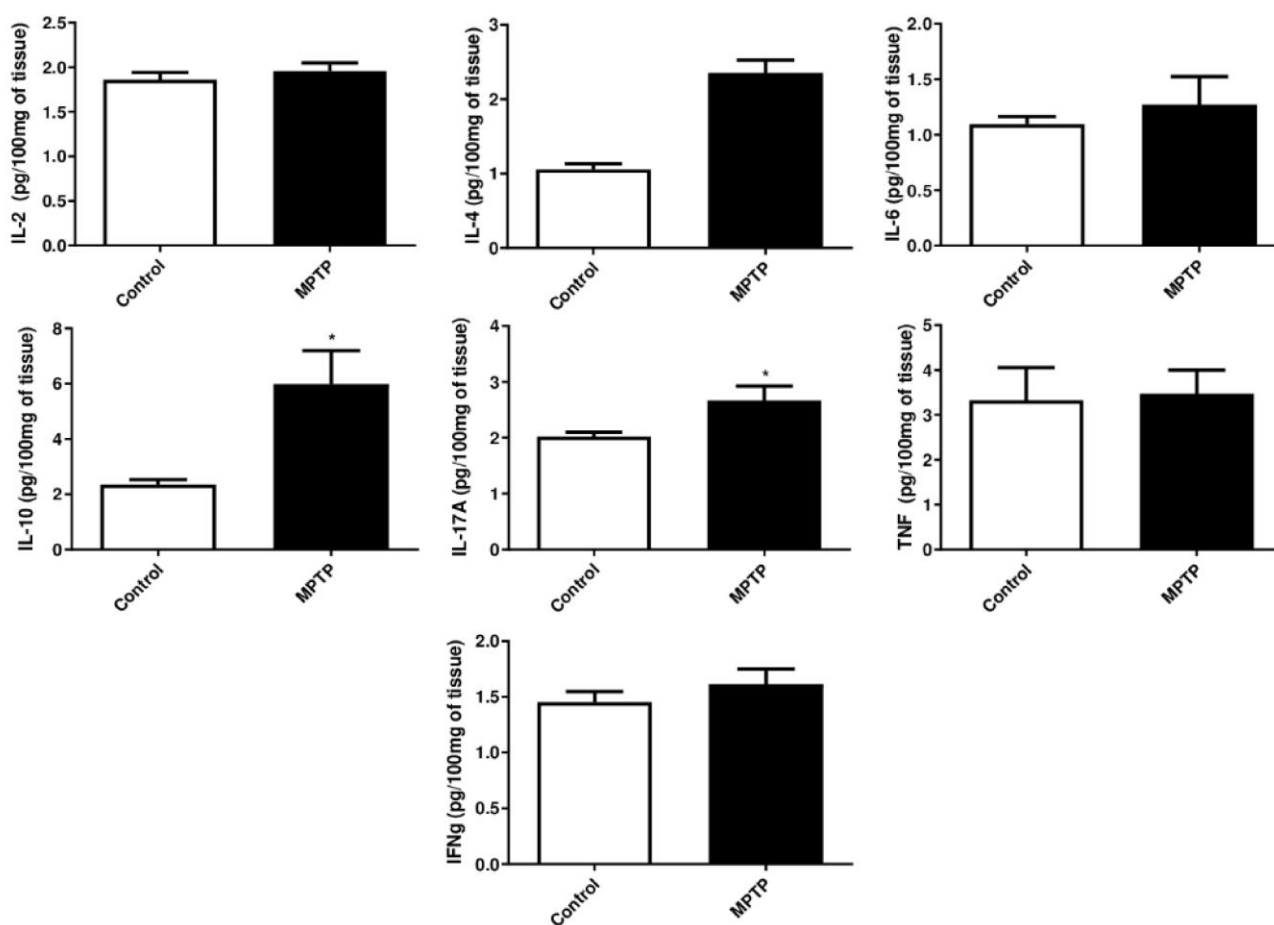


Figura 14: Efeitos de infusão i.n. de MPTP (1 mg / narina) nos níveis de citocinas no SN (n = 6 animais / grupo). Os dados são expressos como a média \pm S.E.M. das citocinas (pg / 100 mg de tecido). * $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com solução salina.

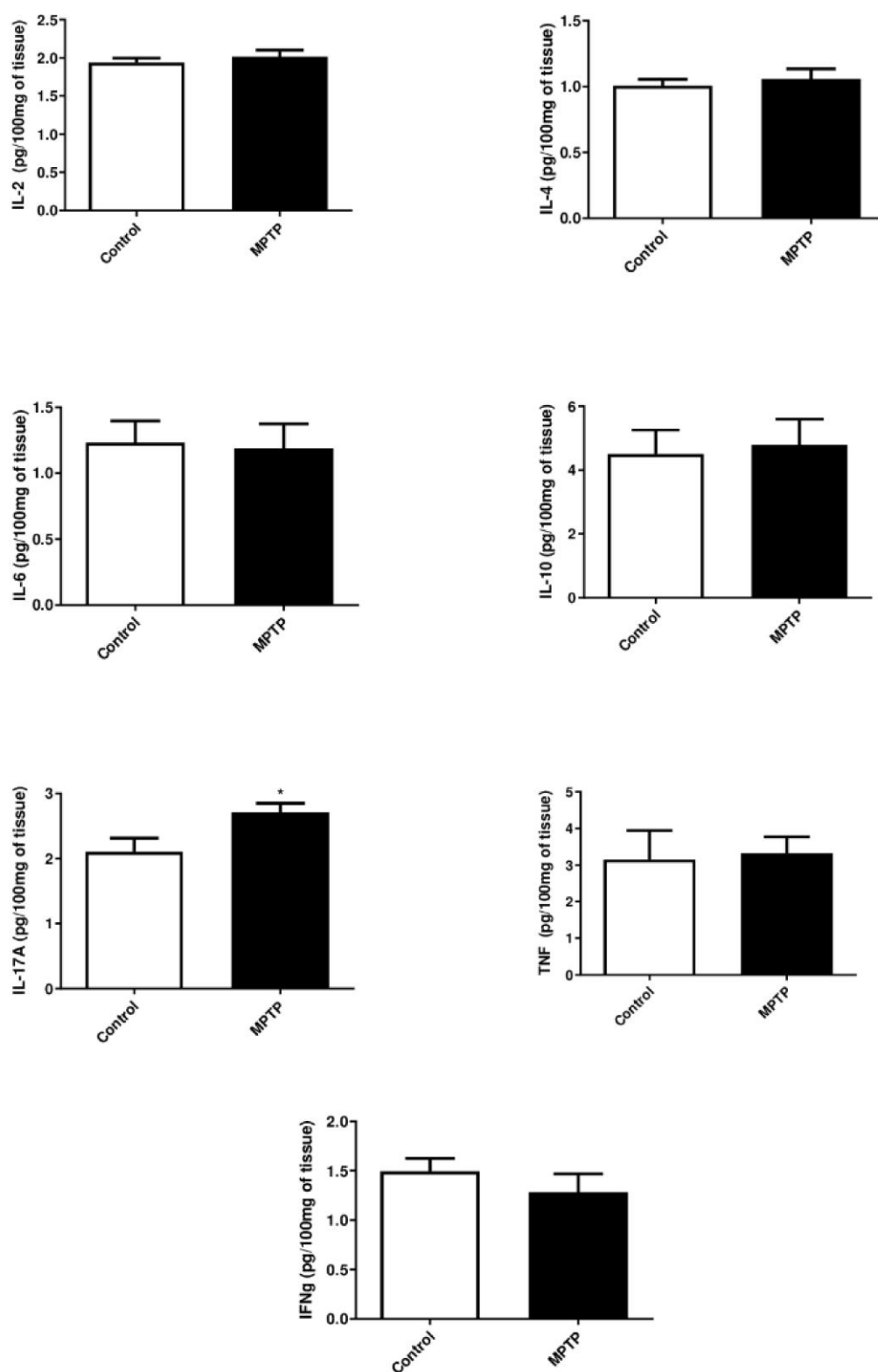


Figura 15: Efeitos de i.n. infusão de MPTP (1 mg / narina) nos níveis de citocinas no corpo estriado (n = 6 animais / grupo). Os dados são expressos como a média \pm S.E.M. das citocinas (pg / 100 mg de tecido). * p < 0,05 em comparação ao grupo controle.

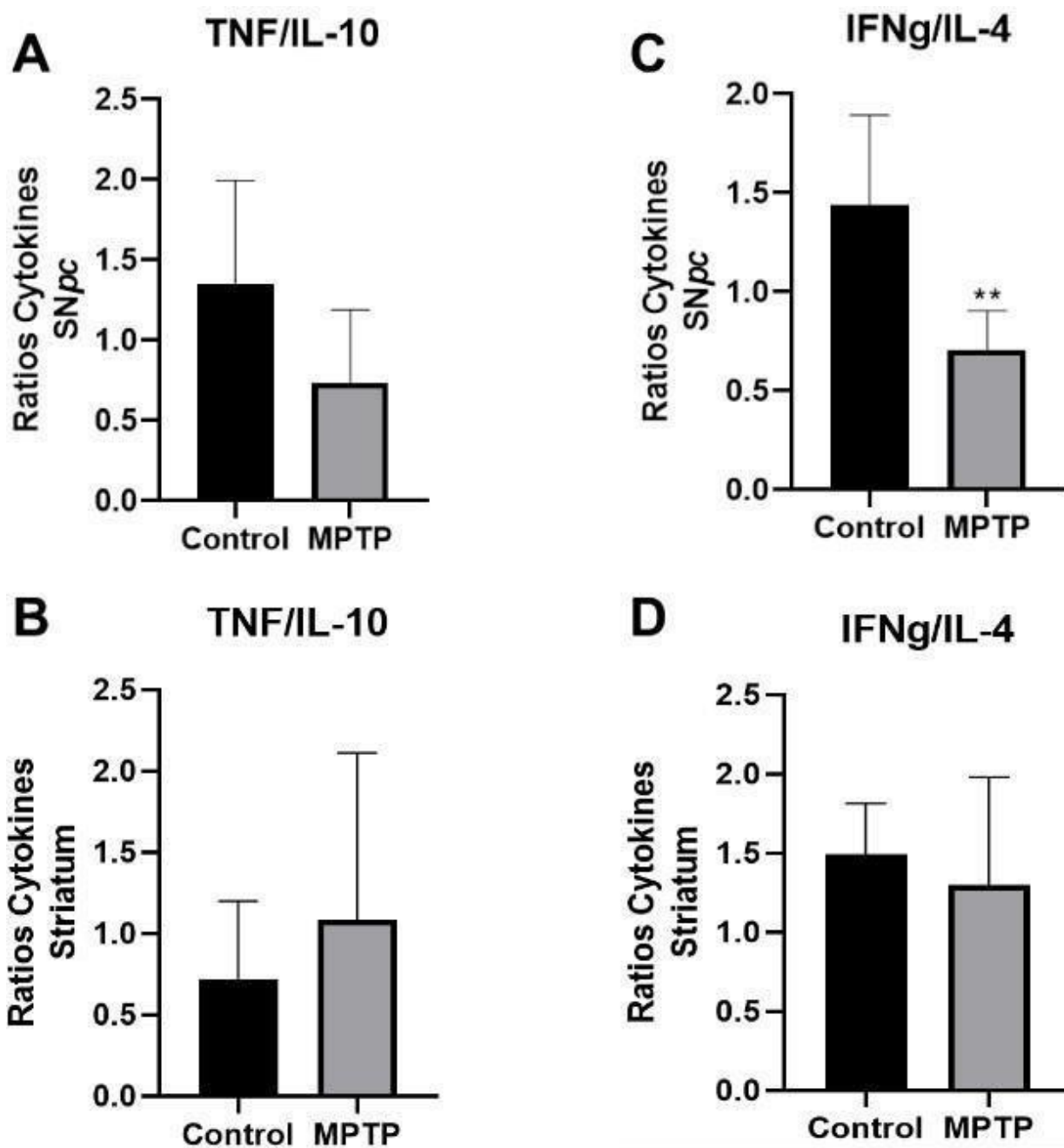


Figura 16: Razões entre as quantidades relativas de TNF / IL-10 e IFN- γ / IL-4 na SN (Fig. 16.A e 16.C) e no estriado (Fig. 16.B e 16.D) de camundongos. (** P < 0,01; n = 6 por grupo).

As razões entre a expressão de citocinas representadas na figura 16 mostraram que a razão TNF / IL-10 no SNpc e estriado (Fig. 16.A e 16.B, respectivamente) não mostraram diferenças entre os grupos ($p = 0,085$ e $p = 0,445$). Já a razão IFN- γ / IL-4 no SN (fig 16.C) foi maior no grupo tratado por MPTP em comparação com o grupo controle ($p = 0,0047$), indicando assim um predomínio de IFN- γ em relação a IL-4 nos animais que sofreram o insulto por MPTP. A razão IFN- γ / IL-4 no estriado não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos ($p = 0,5398$).

5.5. Fatores neurotróficos

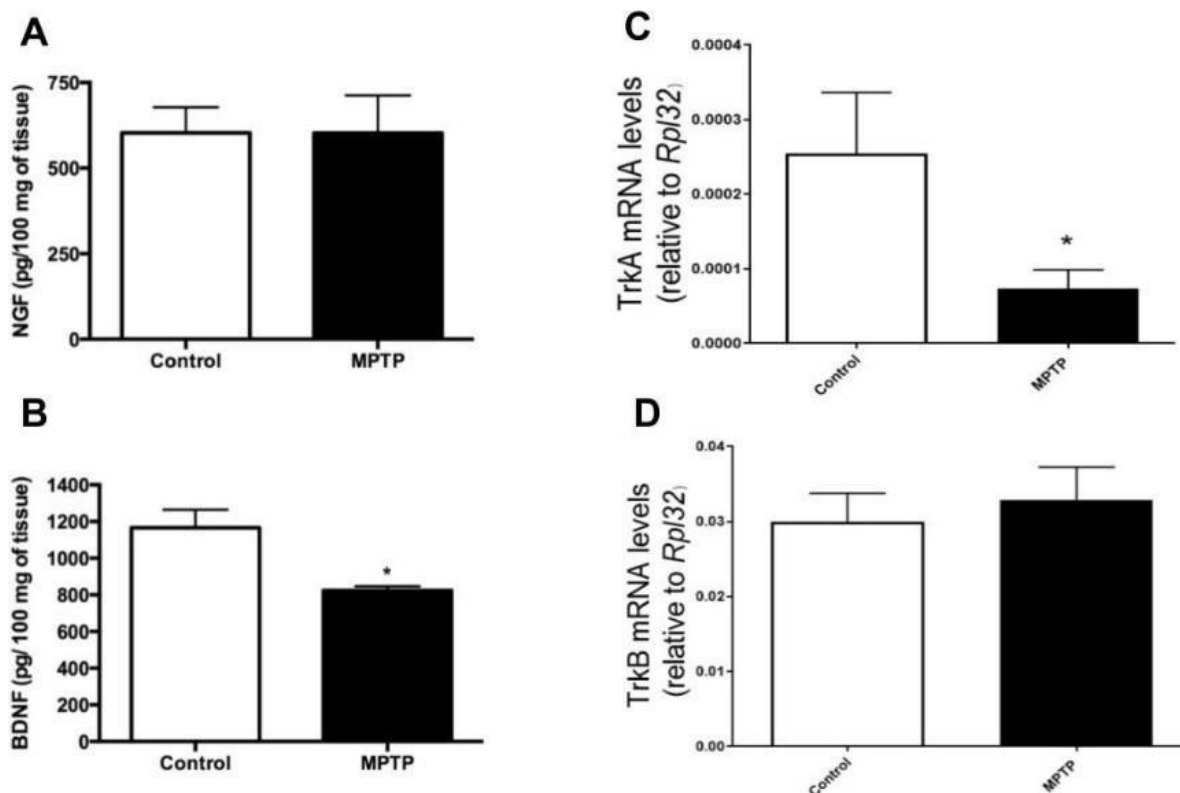


Figura 17: Os efeitos de infusão de MPTP (1 mg / narina) em fatores neurotróficos da SN. Em A e B, BDNF e NGF, respectivamente e os receptores em C e D, TrkB e TrkA, respectivamente (n = 4 animais / grupo). Os dados são expressos como a média \pm S.E.M. do BDNF e NGF (pg / 100 mg de tecido). * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001 em comparação com o grupo tratado com solução salina.

Além da dosagem de citocinas, realizamos a quantificação de fatores neurotróficos na SN e no estriado. Onze dias após a infusão por MPTP, os níveis de BDNF mostraram uma redução (p < 0,05, n = 4) no SN em comparação com o grupo de controle (figuras 17.A e 17.B). Nenhuma diferença foi observada nos níveis de NGF no SN em ambos os grupos. Depois disso, usando uma RT-PCR, investigamos a expressão de mRNAs de trkA e trkB. Os níveis de mRNA de TrkA diminuíram no grupo tratado com MPTP (p = 0,0391) e a expressão de mRNA de TrkB não mostrou diferenças (p = 0,6374) entre os grupos no SNpc (Fig. 17.C e 17.D).

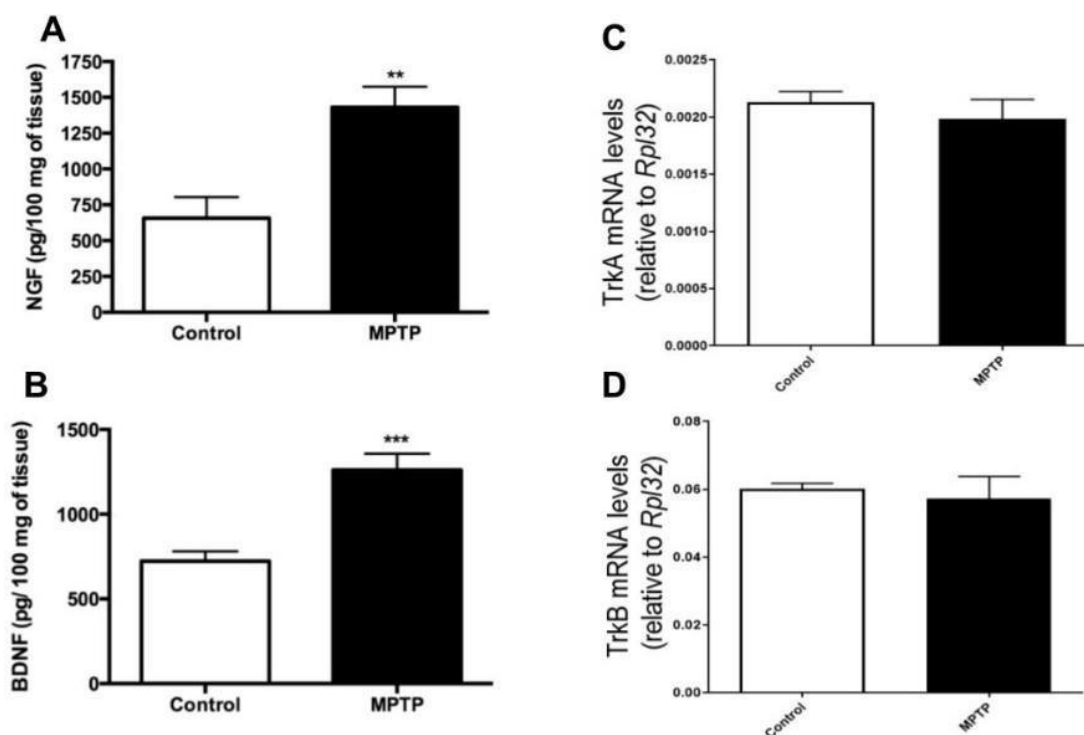


Figura 18: Os efeitos do MPTP em fatores neurotróficos no estriado. Em A e B são mostrados os níveis de BDNF e NGF, respectivamente e os receptores em C e D, sendo TrkB e TrkA, respectivamente. (n = 4 animais / grupo). Os dados são expressos como a média \pm S.E.M. do BDNF ou NGF (pg / 100 mg de tecido). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ em comparação com o grupo tratado com solução salina.

Um nível aumentado pode ser observado em BDNF e NGF ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente) no estriado (Fig. 18.A e 18.B). Os níveis de mRNA de TrkA e TrkB não apresentaram diferenças entre os grupos estudados na região estriatal, $p = 0,485$ e $0,716$, respectivamente (Fig. 18.C e 18.D).

6. DISCUSSÃO

Há evidências crescentes que o paciente com DP, além de sofrer com os sintomas motores, também sofre de comprometimento cognitivo e condições psiquiátricas, por exemplo, ansiedade e depressão, distúrbios do sono e demência. Embora esses sintomas sejam clinicamente importantes, há limitados modelos animais capazes de reproduzir esses sintomas (Francardo, Iderberg et al. 2014).

Neste estudo, não foram observados déficits motores em camundongos que receberam MPTP em comparação ao controle (fig. 9A), caracterizando um estágio pré-motor da doença. O mesmo resultado foi observado por Prediger, Aguiar et al. (2010) usando o mesmo protocolo de administração MPTP, mas com maior intervalo entre a administração e o teste para avaliar o comprometimento motor.

O teste de reconhecimento olfatório foi aplicado no 5º dia após a infusão e mostrou um resultado significativo de perda olfatória nos animais que foram tratados com MPTP (fig. 4). A hiposmia é um dos sintomas não motores mais prevalentes em pacientes com DP e há evidências de que podem aparecer vários anos antes dos distúrbios motores (Müller et al., 2005; Hayes, 2019). Nosso resultado confirma que o modelo em questão mimetiza aspectos relevantes do estágio inicial da doença.

No teste claro-escuro (Fig. 7) e no labirinto em cruz elevado (Fig. 8), o comportamento do tipo ansioso não foi identificado. Em Prediger et al. (2010), o teste do labirinto em cruz elevado também não produziu diferenças estatísticas no 5º dia após a administração por MPTP. Em nosso estudo, o teste foi realizado no 10º dia e o resultado foi semelhante. Por outro lado, nossos resultados indicam uma resposta significativa relacionada à ansiedade de camundongos administrados com MPTP, em relação ao controle, em teste de campo aberto (fig. 9B e 9C).

Embora o teste do labirinto em cruz elevado, o teste claro / escuro e o teste de campo aberto sejam usados para avaliar o comportamento semelhante à ansiedade, estudos indicam que esses testes avaliam diferentes aspectos do comportamento semelhante à ansiedade, como ansiedade de espaço claro no teste de claro e escuro, ansiedade de espaço aberto como no teste de campo aberto e aversão natural dos ratos por áreas abertas e elevada, avaliado pelo teste de labirinto em cruz elevado (Komada, Takao & Miyakawa, 2008). Assim, tanto o teste de transição claro escuro, o teste de campo aberto e o teste do labirinto em cruz elevado são importantes para avaliar as diferentes facetas do comportamento dos

camundongos. Os transtornos de ansiedade na DP são comumente observados, afetando 20-40% dos pacientes e estão associados à função de monoamina alterada e à inflamação (Schrag 2004, Duivis, Vogelzangs et al. 2013, McDonald 2015).

A tirosina hidroxilase é uma importante enzima que participa da cascata de produção de dopamina, convertendo a tirosina em DOPA e, portanto, está presente em neurônios dopaminérgicos (Dunkley & Dickson, 2019). Os primeiros sintomas motores de DP aparecem quando cerca de 60-70% das células dopaminérgicas SNpc tirosina hidroxilase-positivas (TH-positivas) são degeneradas (Armstrong & Okun, 2020), e é importante quantificar a morte neuronal no modelo de fase pré-clínica da doença. Nossos resultados mostram uma diminuição dos neurônios TH imunorreativos no SNpc 11 dias após a infusão intranasal de MPTP, evidenciando o início da morte neuronal na região que é a principal afetada na DP. As deficiências apresentadas por este modelo animal parecem análogas às observadas durante a fase inicial da DP, em que os sintomas não-motores aparecem antes dos sintomas motores (Prediger et al. 2010). Rojo et al. (2006) observou redução drástica dos neurônios TH imunorreativos após 30 dias de injeção diária de MPTP e diminuição da atividade locomotora, caracterizando um modelo crônico da doença. Nosso estudo, assim como em Prediger, Aguiar et al. (2010), apresentam redução moderada desses neurônios e não apresentam déficit locomotor, caracterizando o início da neurodegeneração associada ao aparecimento de sintomas não motores como a perda olfatória.

Em relação às células gliais, nossos resultados mostraram astrogliose (aumento da marcação de GFAP) e microgliose (aumento da marcação de Iba-1) no SNpc (Fig. 12 e 13, respectivamente) em animais que receberam MPTP. A composição celular dessa região é substancial para investigar as causas da neurodegeneração que resulta na doença. Em um estudo realizado com cérebros humanos *postmortem*, Flores-Cuadrado, Saiz-Sanchez et al. (2021) foi constatado astrogliose e microgliose no bulbo olfatório de indivíduos com DP. Liang, Chen et al. (2019) também demonstraram o aumento dessas células no SNpc em camundongos utilizando o modelo de DP fazendo administração subcutânea de 5 doses de 30mg / kg de MPTP, em um período em que os animais já apresentavam comprometimento motor. Em nosso estudo, mostramos que a alteração morfológica nessa região já é evidente mesmo após uma única administração de MPTP e na fase inicial e não-motora da doença.

O MPTP é um potente inibidor do complexo I mitocondrial causando perda de energia celular, produção de ROS, apoptose, inflamação e consequente degeneração de

neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal. A microglia com perfil inflamatório exacerbado é tóxica para os neurônios, em parte devido à liberação de fatores pró-inflamatórios incluindo IL-1 β , TNF- α , IL-6, óxido nítrico (NO), prostaglandina E2 (PGE2) e superóxido radical (Stone, Reynolds et al. 2009). Neste estudo, avaliamos as concentrações de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 e IL-17A no SNpc e estriado 11 dias após a infusão intranasal de MPTP. Encontramos aumento significativo de IL-10 e IL-17A no SNpc (fig.14) e IL-17A no corpo estriado (fig. 15) em relação ao grupo salina. IL-17A atua em múltiplas células residentes no SNC para potencializar a inflamação. Também foi confirmado em experimentos com animais que a IL-17A desempenha um papel no desenvolvimento da DP. Neurodegeneração dopaminérgica, comprometimento motor e ruptura da barreira hematoencefálica são aliviados em camundongos com deficiência de IL-17A (Liu *et al.*, 2019).

No entanto, a diminuição do nível plasmático de IL-17A é encontrada em pacientes com DP em comparação com controles. Embora o mecanismo específico da IL-17A em doenças neurodegenerativas ainda seja controverso, é geralmente aceito que a IL-17A causa doenças ativando células gliais (especialmente micróglia). Em um modelo de DP, a IL-17A ativa a micróglia *in vitro* e acelera a morte de neurônios dopaminérgicos através da ativação de células microgliais (Liu *et al.*, 2019). Já IL-10 tem a capacidade de atuar de forma neuroprotetora, inibindo a produção de mediadores pró-inflamatórios microgliais (Kwilasz *et al.*, 2015). A ativação dos receptores de IL-10 leva à inibição da liberação de TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-23 e aumento da liberação de mediadores anti-inflamatórios, como o antagonista do receptor de IL-1 e receptores solúveis de TNF de células imunes inatas (Kwilasz *et al.*, 2015).

Em relação aos fatores neurotróficos, nossos resultados mostram uma diminuição significativa nos níveis de BDNF e nenhuma alteração significativa no NGF na SN. Embora os níveis de NGF permaneçam semelhantes em relação ao grupo controle, foi observado um aumento na expressão de TrkA no SN (fig.17).

TrkA é o receptor de NF mais relacionado ao NGF e sua regulação. No corpo estriado, observou-se aumento significativo nos níveis de BDNF e NGF, não havendo diferença na expressão dos receptores TrkA e TrkB (fig.18). Uma vez que este é um modelo de estágio inicial, parece que o aumento dessas moléculas no estriado pode estar relacionado a uma tentativa de compensar a diminuição da proteção mediada por NGF e BDNF na via de entrada proveniente da SN. Um mecanismo de proteção do NGF é prevenir a atividade da caspase-3 (Shimoke e Chiba 2001), mas com o desenvolvimento da doença o processo pró-inflamatório se sobrepõe ao processo anti-inflamatório

Nossos resultados apresentam novas informações sobre o modelo semelhante à DP descrito por Prediger *et al.* (2010) com foco no estágio pré-motora da doença e suas alterações neuroinflamatórias. Este é o primeiro estudo usando este modelo de estágio inicial que mostra níveis aumentados de IL-17A em ambos SNpc e estriado, e ainda avalia os níveis de BDNF, NGF e seus receptores em ambas as regiões. Este fato pode auxiliar no entendimento do desenvolvimento do processo inflamatório da DP e possível intervenção clínica na fase prodômica da doença.

7. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nossos resultados permitem concluir que infusão i.n. de MPTP (1mg/narina) em camundongos C57BL/6 mimetizou aspectos cruciais presentes na fase pré-clínica da doença, sendo eles:

- Alteração na memória olfatória após 5 dias da administração de MPTP;
- Déficit no reconhecimento social no 6º dia, indicando alteração cognitiva;
- Comportamento do tipo ansioso quando avaliado por teste de campo aberto no 11º dia após infusão i.n. por MPTP;
- Diminuição dos neurônios dopaminérgicos na SNpc antes do aparecimento dos sintomas motores;
- Ativação microglial e astrócistica na SNpc no 11º dia;
- Aumento dos níveis de IL-10 e IL-17 na SNpc e de IL-17 no núcleo estriado, bem como a razão IFN / IL-4 indicando um perfil pró-inflamatório na SNpc;
- Diminuição dos níveis de BDNF e TrkA na SNpc,
- Aumento dos níveis de BDNF e NGF no estriado, sem alteração da expressão dos seus receptores.

Nossos resultados contribuem para a melhor descrição do modelo da fase pré-clínica da doença e abre perspectivas para futuras pesquisas de tratamento dos sintomas não-motores, bem como para a busca de um biomarcador para que o diagnóstico da doença seja possível antes que a morte neuronal já esteja em estágio avançado. Esta fase latente de neurodegeneração na DP é de particular relevância em relação ao desenvolvimento de terapias modificadoras da doença ou neuroprotetoras que exigiriam intervenção nos estágios iniciais da doença.

Apesar disso, é importante ressaltar que o modelo de infusão intranasal de MPTP apresenta limitações por não mimetizar completamente a histopatologia da DP, como ausência dos corpúsculos de Lewy, importante marcador da doença.

8. REFERÊNCIAS

- Allaman, I., Bélanger, M., & Magistretti, P. J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends in neurosciences*, 34(2), 76–87. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2010.12.001>
- Allen, S. J., Watson, J. J., Shoemark, D. K., Barua, N. U., & Patel, N. K. (2013). GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 138, Issue 2, pp. 155–175). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.004>
- Angoa-Pérez, M., Kane, M. J., Briggs, D. I., Francescutti, D. M., & Kuhn, D. M. (2013). Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (82), 50978. <https://doi.org/10.3791/50978>
- Armstrong, M. J., & Okun, M. S. (2020). Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. *JAMA*, 323(6), 548–560. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.22360>
- Baig, F., Lawton, M., Rolinski, M., Ruffmann, C., Nithi, K., Evetts S.G., et al., Delineating nonmotor symptoms in early Parkinson's disease and first-degree relatives, *Mov. Disord.* (2015)
- Baldi, I., Cantagrel, A., Lebailly, P., Tison, F., Dubroca, B., Chrysostome, V., Dartigues, J. F., & Brochard, P. (2003). Association between Parkinson's disease and exposure to pesticides in southwestern France. *Neuroepidemiology*, 22(5), 305–310. <https://doi.org/10.1159/000071194>
- Barbosa, M. T., Caramelli, P., Maia, D. P., Cunningham, M. C. Q., Guerra, H. L., Lima-Costa, M. F., & Cardoso, F. (2006). Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí Study). *Movement Disorders*, 21(6), 800–808. <https://doi.org/10.1002/mds.20806>

Barcia C., Ros, C.M., Annese, V., Gomez, A., Ros-Bernal, F., Aguado-Yera, D., MartínezPaga, M.E., De Pablos, V., Fernandez-Villalba, E., Herrero, M.T. (2011). IFN-gama Signaling, With The Synergistic Contribution Of TNF-A, Mediates Cell Specific Microglial And Astroglial Activation In Experimental Models Of Parkinson's Disease. *Cell Death And Disease*, 2, 142-2011

Batista, C., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., & de Oliveira, A. (2019). Lipopolysaccharide-Induced Neuroinflammation as a Bridge to Understand Neurodegeneration. *International journal of molecular sciences*, 20(9), 2293. <https://doi.org/10.3390/ijms20092293>

Blesa, J., Phani, S., Jackson-Lewis, V., & Przedborski, S. (2012). Classic and new animal models of Parkinson's disease. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 845618. <https://doi.org/10.1155/2012/845618>

Blum, R., & Konnerth, A. (2005). Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: Mechanisms and functions. In *Physiology* (Vol. 20, Issue 1, pp. 70–78). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/physiol.00042.2004>

Bovolenta, Tânia Maria, & Felício, André Carvalho. (2016). Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. *Einstein (São Paulo)*, 14(3), 7-9. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082016ED3780>

Braak, H., Ghebremedhin, E., Rüb, U., Bratzke, H., & Del Tredici, K. (2004). Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. *Cell and tissue research*, 318(1), 121–134. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0956-9>

Calabrese, V., Santoro, A., Monti, D., Crupi, R., Di Paola, R., Latteri, S., Cuzzocrea, S., Zappia, M., Giordano, J., Calabrese, E. J., & Franceschi, C. (2018). Aging and Parkinson's Disease: Inflammaging, neuroinflammation and biological remodeling as key factors in pathogenesis. *Free radical biology & medicine*, 115, 80–91. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.379>

Chia, S. J., Tan, E. K., & Chao, Y. X. (2020). Historical Perspective: Models of Parkinson's Disease. *International journal of molecular sciences*, 21(7), 2464. <https://doi.org/10.3390/ijms21072464>

Chinta, S. J., & Andersen, J. K. (2005). Dopaminergic neurons. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 37, Issue 5 SPEC. ISS., pp. 942–946). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.09.009>

Chen, H., Huang, X., Guo, X., Mailman, R. B., Park, Y., Kamel, F., Umbach, D. M., Xu, Q., Hollenbeck, A., Schatzkin, A., & Blair, A. (2010). Smoking duration, intensity, and risk of Parkinson disease. *Neurology*, 74(11), 878–884. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181d55f38>

Chen, H., Zhang, S. M., Hernán, M. A., Willett, W. C., & Ascherio, A. (2002). Diet and Parkinson's disease: a potential role of dairy products in men. *Annals of neurology*, 52(6), 793–801. <https://doi.org/10.1002/ana.10381>

D'Agostino, P.M., Gottfried-Blackmore, A., Sabapathy, A. N., Bulloch, K. (2012). Brain dendritic cells: biology and pathology, *Acta Neuropathol.* 124 (5) 599–614,

Dauer W. & Przedborski S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms And Models. *Neuron.* 39, 889-909.

Dickson, D. W. (2018). Neuropathology of Parkinson disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 46, S30–S33. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2017.07.033>

Doty, R. L. (2008). "The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable?" *Ann Neurol* 63(1): 7-15.

Doty, R. L., D. A. Deems and S. Stellar. (1988). "Olfactory dysfunction in Parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease state, or disease duration." *Neurology* 38(8): 1237-1244.

Duivis, H. E., N. Vogelzangs, N. Kupper, P. de Jonge and B. W. Penninx (2013). "Differential association of somatic and cognitive symptoms of depression and anxiety with inflammation: findings from the Netherlands Study of Depression and Anxiety (NESDA)." *Psychoneuroendocrinology* 38(9): 1573-1585

Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1357–91.

Dunkley, P. R., & Dickson, P. W. (2019). Tyrosine hydroxylase phosphorylation in vivo. *Journal of neurochemistry*, 149(6), 706–728. <https://doi.org/10.1111/jnc.14675>

Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., & Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Revue neurologique*, 172(1), 14–26. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.09.012>

Ferreira, R. N., de Miranda, A. S., Rocha, N. P., Simoes E Silva, A. C., Teixeira, A. L., & da Silva Camargos, E. R. (2018). Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: What Have we Learned from Pre-Clinical and Clinical Studies?. *Current medicinal chemistry*, 25(31), 3682–3702. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180313101536>

Ferrer, I., Martinez, A., Blanco, R., Dalfo, E., Carmona, M. (2011). Neuropathology Of Sporadic Parkinson Disease Before The Appearance Of Parkinsonism: Preclinical Parkinson Disease. *J. Neural Transm.* 118, 821-839.

Fillit, H., Ding, W. H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., Wolf-Klein, G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 129, 318–320

Flores-Cuadrado, A., Saiz-Sanchez, D., Mohedano-Moriano, A., Lamas-Cenfor, E., Leon-Olmo, V., Martinez-Marcos, A., & Ubeda-Bañon, I. (2021). Astrogliosis and sexually dimorphic neurodegeneration and microgliosis in the olfactory bulb in

Parkinson's disease. *Npj Parkinson's Disease*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41531-020-00154-7>

Francardo, V., I. Iderberg, H. Lindgren and M. A. Cenci (2014). Rodent Models of Treatment-Related Complications in Parkinson Disease. *Movement Disorders*. M. S. LeDoux, Elsevier: 373-386.

Gelders, G., Baekelandt, V., & Van der Perren, A. (2018). Linking Neuroinflammation and Neurodegeneration in Parkinson's Disease. *Journal of immunology research*, 2018, 4784268. <https://doi.org/10.1155/2018/4784268>

Guo, M., Wang, J., Zhao, Y., Feng, Y., Han, S., Dong, Q., Cui, M., & Tieu, K. (2020). Microglial exosomes facilitate α -synuclein transmission in Parkinson's disease. *Brain*, 143(5), 1476–1497. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa090>

Hayes M. T. (2019). Parkinson's Disease and Parkinsonism. *The American journal of medicine*, 132(7), 802–807. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2019.03.001>

Henry, J., Smeyne, R. J., Jang, H., Miller, B., & Okun, M. S. (2010). Parkinsonism and neurological manifestations of influenza throughout the 20th and 21st centuries. *Parkinsonism & related disorders*, 16(9), 566–571. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2010.06.012>

Hindle, J. (2010). Ageing, Neurodegeneration And Parkinson's Disease. *Age Ageing* 39, 156- 161

Hirsch, L., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T., & Pringsheim, T. (2016). The Incidence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*, 46(4), 292–300. <https://doi.org/10.1159/000445751>

Hyman, C., Hofer, M., Barde, Y. A., Juhasz, M., Yancopoulos, G. D., Squinto, S. P., & Lindsay, R. M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 350(6315), 230–232. <https://doi.org/10.1038/350230a0>

Jankovic, J., & Tan, E. K. (2020). Parkinson's disease: etiopathogenesis and treatment. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 91(8), 795–808.

<https://doi.org/10.1136/jnnp-2019-322338>

Jang, H., Boltz, D. A., Webster, R. G., & Smeyne, R. J. (2009). Viral parkinsonism. *Biochimica et biophysica acta*, 1792(7), 714–721.

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2008.08.001>

Jiang, W., Ju, C., Jiang, H., & Zhang, D. (2014). Dairy foods intake and risk of Parkinson's disease: a dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *European journal of epidemiology*, 29(9), 613–619.

<https://doi.org/10.1007/s10654-014-9921-4>

Joe, E. H., Choi, D. J., An, J., Eun, J. H., Jou, I., & Park, S. (2018). Astrocytes, Microglia, and Parkinson's Disease. *Experimental neurobiology*, 27(2), 77–87.

<https://doi.org/10.5607/en.2018.27.2.77>

Kam, T. I., Hinkle, J. T., Dawson, T. M., & Dawson, V. L. (2020). Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. In *Neurobiology of Disease* (Vol. 144).

Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105028>

Kawanokuchi, J., Shimizu, A., Nitta, K., Yamada, T., Mizuno, H., Takeuchi, and A. Suzumura (2008). "Production and functions of IL-17 in microglia." *J Neuroimmunol* 194(1-2): 54-61.

Keath, J. R., Iacoviello, M. P., Barrett, L. E., Mansvelder, H. D., McGehee, D. S. (2007). Differential Modulation By Nicotine Of Substantia Nigra Versus Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Neurophysiol* 98, 3388-3396.

Keefe, K. M., Sheikh, I. S., & Smith, G. M. (2017). Targeting neurotrophins to specific populations of neurons: NGF, BDNF, and NT-3 and their relevance for treatment of

spinal cord injury. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18030548>

Komada, M., Takao, K., & Miyakawa, T. (2008). "Elevated plus maze for mice." *Journal of visualized experiments: JoVE*, 22: 1088.

Kwilasz, A. J., P. M. Grace, P. Serbedzija, S. F. Maier and L. R. Watkins (2015). "The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases." *Neuropharmacology* 96(Pt A): 55-69.

Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., & Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, 219(4587), 979–980. <https://doi.org/10.1126/science.6823561>

Langston J. W. (2017). The MPTP Story. *Journal of Parkinson's disease*, 7(s1), S11–S19. <https://doi.org/10.3233/JPD-179006>

Levy, G. (2007). The Relationship Of Parkinson Disease With Aging. *Arch. Neurol.*, 64(9), 1242-1246.

Lezak, K. R., Missig, G., & Carlezon, W. A., Jr (2017). Behavioral methods to study anxiety in rodents. *Dialogues in clinical neuroscience*, 19(2), 181–191. <https://doi.org/10.31887/DCNS.2017.19.2/wcarlezon>

Li, T., Huang, Y., Cai, W., Chen, X., Men, X., Lu, T., Wu, A., & Lu, Z. (2020). Age-related cerebral small vessel disease and inflammaging. In *Cell Death and Disease* (Vol. 11, Issue 10). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03137-x>

Liang, Y., Chen, C., Xia, B., Wu, W., Tang, J., Chen, Q., Tang, L., Yang, H., Zhang, Z., Lu, Y., Yang, Y., & Zhao, Y. (2019). Neuroprotective Effect of Echinacoside in Subacute Mouse Model of Parkinson's Disease. *BioMed Research International*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4379639>

Liddel, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Münch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., . . . Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481–487. <https://doi.org/10.1038/nature21029>

Liu, R., Guo, X., Park, Y., Huang, X., Sinha, R., Freedman, N. D., Hollenbeck, A. R., Blair, A., & Chen, H. (2012). Caffeine intake, smoking, and risk of Parkinson disease in men and women. *American journal of epidemiology*, *175*(11), 1200–1207. <https://doi.org/10.1093/aje/kwr451>

Lotankar, S., Prabhavalkar, K. S., & Bhatt, L. K. (2017). Biomarkers for Parkinson's Disease: Recent Advancement. *Neuroscience bulletin*, *33*(5), 585–597. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0183-5>

Mahlknecht, P., Seppi, K., & Poewe, W. (2015). The concept of prodromal Parkinson's disease. In *Journal of Parkinson's Disease* (Vol. 5, Issue 4, pp. 681–697). IOS Press. <https://doi.org/10.3233/JPD-150685>

Mahul-Mellier, A.-L., Burtscher, J., Maharjan, N., Weerens, L., Croisier, M., Kuttler, F., Leleu, M., Knott, G. W., & Lashuel, H. A. (n.d.). *The process of Lewy body formation, rather than simply α -synuclein fibrillization, is one of the major drivers of neurodegeneration.* <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.11842389.v2>

Mangano, E. N., Hayley, S. (2009). Inflammatory Priming Of The Substantia Nigra Influences The Impact Of Later Paraquat Exposure: Neuroimmune Sensitization Of Neurodegeneration. *Neurobiology Of Aging*, *30* (9), 1361-1378.

McDonald, M. P. (2015). *Methods and Models of the Nonmotor Symptoms of Parkinson Disease. Movement Disorders*, 387–412. <https://doi:10.1016/b978-0-12-405195-9.00023-8>

Miller, D. B., & O'Callaghan, J. P. (2015). Biomarkers of Parkinson's disease: Present and future. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 64(3), S40–S46. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.030>

Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T. (1994) Interleukin 1-Beta, Interleukin-6, Epidermal Growth Factor And Transforming Growth Factor-Alpha Are Elevated In The Brain From Parkinsonian Patients. *Neurosci. Lett.*, 180 (2), 147-150.

Mogia, M., A. Togaria, T. Kondob, Y. Mizunob, O. Komurec, S. Kunoc, H. Ichinosed and T. Nagatsu (1999). "Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease." *Neuroscience Letters* 270(1): 45-48.

Moynes, D. M., S. J. Vanner and A. E. Lomax (2014). "Participation of interleukin 17A in neuroimmune interactions." *Brain Behav Immun* 41: 1-9.

Mueller, A., Abolmaali, N. D., Hakimi, A. R., Gloeckler, T., Herting, B., Reichmann, H., & Hummel, T. (2005). Olfactory bulb volumes in patients with idiopathic Parkinson's disease a pilot study. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 112(10), 1363–1370. <https://doi.org/10.1007/s00702-005-0280-x>

Nagatsu, T., Mogi, M., Ichinose, H., & Togari, A. (2000). Changes in cytokines and neurotrophins in Parkinson's disease. *Journal of neural transmission. Supplementum*, (60), 277–290. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6301-6_19

Nalls, M. A., Blauwendraat, C., Vallerga, C. L., Heilbron, K., Bandres-Ciga, S., Chang, D., Tan, M., Kia, D. A., Noyce, A. J., Xue, A., Bras, J., Young, E., von Coelln, R., Simón-Sánchez, J., Schulte, C., Sharma, M., Krohn, L., Pihlstrøm, L., Siitonen, A., . . . Zhang, F. (2019). Identification of novel risk loci, causal insights, and heritable risk for Parkinson's disease: a meta-analysis of genome-wide association studies. *The Lancet Neurology*, 18(12), 1091–1102. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30320-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30320-5)

Ferreira-Junior, N. C., Campos, A. C., Guimarães, F. S., Del-Bel, E., Zimmermann, P., Brum Junior, L., Hallak, J. E., Crippa, J. A., & Zuardi, A. W. (2020). Biological bases for a possible effect of cannabidiol in Parkinson's disease. *Revista brasileira de psiquiatria* (Sao Paulo, Brazil : 1999), 42(2), 218–224. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2019-0460>

Ossowska, K., Wardas, J., Smiałowska, M., Kuter, K., Lenda, T., Wierońska, J. M., Zieba, B., Nowak, P., Dabrowska, J., Bortel, A., Kwieciński, A., & Wolfarth, S. (2005). A slowly developing dysfunction of dopaminergic nigrostriatal neurons induced by long-term paraquat administration in rats: an animal model of preclinical stages of Parkinson's disease?. *The European journal of neuroscience*, 22(6), 1294–1304. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2005.04301.x>

Pajares, M., I Rojo, A., Manda, G., Boscá, L., & Cuadrado, A. (2020). Inflammation in Parkinson's Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. In *Cells* (Vol. 9, Issue 7). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/cells9071687>

Parkinson J. (2002). An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences*, 14(2), 223–222. <https://doi.org/10.1176/jnp.14.2.223>

Pfeiffer, R. F. (2016). Non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, 22, S119–S122. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2015.09.004>

Philippens IHC. Refinement of the MPTP model for Parkinson's disease in the marmoset, *Drug Discov Today: Dis Model* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.ddmod.2018.10.003>

Picconi, B., Hernández, L. F., Obeso, J. A., & Calabresi, P. (2018). Motor complications in Parkinson's disease: Striatal molecular and electrophysiological

mechanisms of dyskinesias. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society*, 33(6), 867–876. <https://doi.org/10.1002/mds.27261>

Prediger, R. D., Aguiar, A. S., Jr, Rojas-Mayorquin, A. E., Figueiredo, C. P., Matheus, F. C., Ginestet, L., Chevarin, C., Bel, E. D., Mongeau, R., Hamon, M., Lanfumey, L., & Raisman-Vozari, R. (2010). Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 17(2), 114–129. <https://doi.org/10.1007/s12640-009-9087-0>

Qi, Z., Miller, G. W., & Voit, E. O. (2014). Rotenone and paraquat perturb dopamine metabolism: A computational analysis of pesticide toxicity. *Toxicology*, 315(1), 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.11.003>

Radhakrishnan D.M., Goyal V. (2018). Parkinson's disease: A review, *Neurol. India*. 66 S26- S35

Ray, S., & Agarwal, P. (2020). Depression and Anxiety in Parkinson Disease. *Clinics in geriatric medicine*, 36(1), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.09.012>

Reich, S. G., & Savitt, J. M. (2019). Parkinson's Disease. In *Medical Clinics of North America* (Vol. 103, Issue 2, pp. 337–350). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.10.014>

Reichmann H. (2017). Premotor Diagnosis of Parkinson's Disease. *Neuroscience bulletin*, 33(5), 526–534. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0159-5>

Rieder C. R. (2019). GBA mutations and Parkinson's disease in Brazil. *Arquivos de neuro-psiquiatria*, 77(2), 71–72. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190013>

Rieder C. R. (2020). Cannabidiol in Parkinson's disease. *Revista brasileira de psiquiatria (Sao Paulo, Brazil : 1999)*, 42(2), 126–127. <https://doi.org/10.1590/1516-4446-2019-0810>

Rodríguez-Violante, M., Cervantes-Arriaga, A., Fahn, S., & Tolosa, E. (2017). Two-hundred Years Later: Is Parkinson's Disease a Single Defined Entity?. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*, 69(6), 308–313. <https://doi.org/10.24875/RIC.17002291>

Rojo, A. I., Montero, C., Salazar, M., Close, R. M., Fernández-Ruiz, J., SánchezGonzález, M. A., de Sagarra, M. R., Jackson-Lewis, V., Cavada, C., & Cuadrado, A. (2006). Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. *The European journal of neuroscience*, 24(7), 1874–1884. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05060.x>

Rugbjerg, K., Ritz, B., Korbo, L., Martinussen, N., & Olsen, J. H. (2008). Risk of Parkinson's disease after hospital contact for head injury: population based case-control study. *BMJ (Clinical research ed.)*, 337, a2494. <https://doi.org/10.1136/bmj.a2494>

Salari, S., & Bagheri, M. (2019). In vivo, in vitro and pharmacologic models of Parkinson's disease. In *Physiological Research* (Vol. 68, Issue 1, pp. 17–24). Czech Academy of Sciences. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933895>

Savica, R., Rocca, A. W., Ahlskog, J. E. (2010). When Does Parkinson Disease Start? *Arch. Neurol.*, 67 (7), 798-801

Shimoke, K. and H. Chiba (2001). "Nerve Growth Factor Prevents 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-Induced Cell Death Via the Akt Pathway by Suppressing Caspase-3-Like Activity Using PC12 Cells: Relevance to Therapeutical Application for Parkinson's Disease." *Journal of Neuroscience Research* 63(5): 402–409

Simon, D. K., Tanner, C. M., & Brundin, P. (2020). Parkinson Disease Epidemiology, Pathology, Genetics, and Pathophysiology. In *Clinics in Geriatric Medicine* (Vol. 36, Issue 1, pp. 1–12). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cger.2019.08.002>

Spina, M. B., Squinto, S. P., Miller, J., Lindsay, R. M., & Hyman, C. (1992). Brain-derived neurotrophic factor protects dopamine neurons against 6-hydroxydopamine and N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity: involvement of the glutathione system. *Journal of neurochemistry*, 59(1), 99–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08880.x>

Schrag, A. (2004). "Psychiatric aspects of Parkinson's disease: an update." *J Neurol* 251(7): 795-804.

Stone, D. K., A. D. Reynolds, R. L. Mosley and H. E. Gendelman (2009). "Innate and adaptive immunity for the pathobiology of Parkinson's disease." *Antioxidants & Redox Signaling* 11(9): 2151-2166.

Studer, L., Spenger, C., Seiler, R. W., Othberg, A., Lindvall, O., & Odin, P. (1996). Effects of brain-derived neurotrophic factor on neuronal structure of dopaminergic neurons in dissociated cultures of human fetal mesencephalon. *Experimental brain research*, 108(2), 328–336. <https://doi.org/10.1007/BF00228106>

Tang, T., Li, Y., Jiao, Q., Du, X., & Jiang, H. (2017). Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor: A Potential Therapeutic Agent for Parkinson's Disease. In *Neuroscience Bulletin* (Vol. 33, Issue 5, pp. 568–575). Springer Singapore. <https://doi.org/10.1007/s12264-017-0123-4>

Tansey, M. G., & Romero-Ramos, M. (2019). Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. In *European Journal of Neuroscience* (Vol. 49, Issue 3, pp. 364–383). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/ejn.14290>

Tanner, C. M., Kame, F., Ross, G. W., Hoppin, J. A., Goldman, S. M., Korell, M., Marras, C., Bhudhikanok, G. S., Kasten, M., Chade, A. R., Comyns, K., Richards, M. B., Meng, C., Priestley, B., Fernandez, H. H., Cambi, F., Umbach, D. M., Blair, A., Sandler, D. P., & Langston, J. W. (2011). Rotenone, paraquat, and Parkinson's

disease. *Environmental Health Perspectives*, 119(6), 866–872. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002839>

Taylor, K. S. M., Cook, J. A., & Counsell, C. E. (2007). Heterogeneity in male to female risk for Parkinson's disease [1]. In *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* (Vol. 78, Issue 8, pp. 905–906). <https://doi.org/10.1136/jnnp.2006.104695>

Teive, H. A. G. (1998). O PAPEL DE CHARCOT NA DOENÇA DE PARKINSON. In *Arq Neuropsiquiatr* (Vol. 56, Issue 1).

Thobois, S., Prange, S., Sgambato-Faure, V., Tremblay, L., & Broussolle, E. (2017). Imaging the Etiology of Apathy, Anxiety, and Depression in Parkinson's Disease: Implication for Treatment. *Current neurology and neuroscience reports*, 17(10), 76. <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0788-0>

Tysnes, O. B., & Storstein, A. (2017). Epidemiology of Parkinson's disease. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996), 124(8), 901–905. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1686-y>

Ullian, E. M., Sapperstein, S. K., Christopherson, K. S., & Barres, B. A. (2001). Control of synapse number by glia. *Science* (New York, N.Y.), 291(5504), 657–661. <https://doi.org/10.1126/science.291.5504.657>

Urban, P. P., Falkenburger, B., Jost, W. H., Ransmayr, G., Riederer, P., & Winkler, C. (2020). Structure and efferences of the substantia nigra pars compacta in Parkinson's disease. *Fortschritte Der Neurologie Psychiatrie*, 88(9), 591–599. <https://doi.org/10.1055/a-1149-9280>

Victorino, D. B., Guimarães-Marques, M., Nejm, M., Scorza, F. A., & Scorza, C. A. (2020). COVID-19 and Parkinson's Disease: Are We Dealing with Short-term Impacts or Something Worse?. *Journal of Parkinson's disease*, 10(3), 899–902. <https://doi.org/10.3233/JPD-202073>

Wichmann, T. & De Long, M. R. (2003). Functional Neuroanatomy Of The Basal Ganglia In Parkinson'S Disease. *Adv. Neurol.* 91, 9-18.

Wilton, D. K., Dissing-Olesen, L., & Stevens, B. (2019). Neuron-Glia Signaling in Synapse Elimination. *Annual review of neuroscience*, 42, 107–127. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050306>

Wise R. A. (2004). Dopamine, learning and motivation. *Nature reviews. Neuroscience*, 5(6), 483–494. <https://doi.org/10.1038/nrn1406>

Yang, F., Trolle Lagerros, Y., Bellocco, R., Adami, H. O., Fang, F., Pedersen, N. L., & Wirdefeldt, K. (2015). Physical activity and risk of Parkinson's disease in the Swedish National March Cohort. *Brain : a journal of neurology*, 138(Pt 2), 269–275. <https://doi.org/10.1093/brain/awu323>

Yang, Y. & Lu, B. (2009). Mitochondrial Morphogenesis, Distribution, And Parkinson Disease: Insights From PINK1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68(9), 953-963.

Zucca, F.A., Basso, E., Cupaioli, F.A. *et al.* Neuromelanin of the Human Substantia Nigra: An Update. *Neurotox Res* 25, 13–23 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12640-013-9435-y>