

UNIVERSIDA FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Bruna da Silva Oliveira

**ESTUDO DOS EFEITOS DE MODULADORES DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA EM SINAIS NÃO MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON**

Belo Horizonte

Fevereiro/2019

Bruna da Silva Oliveira

**ESTUDO DOS EFEITOS DE MODULADORES DO SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA EM SINAIS NÃO MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Prof.^a Aline Silva de Miranda

Co - Orientadora: Prof.^a Elizabeth Ribeiro da Silva

Belo Horizonte
Fevereiro/2019

043

Oliveira, Bruna da Silva.

Estudo do efeito de moduladores do sistema renina angiotensina em sintomas não motores da Doença de Parkinson [manuscrito] / Bruna da Silva Oliveira. – 2019.

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

Orientadora: Prof.^a Aline Silva de Miranda. Co - Orientadora: Prof.^a Elizabeth Ribeiro da Silva.

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

1. Biologia Celular. 2. Doença de Parkinson. 3. Sistema Renina-Angiotensina. 4. Ansiedade. 5. Depressão. 6. 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetra-Hidropiridina. I. Miranda, Aline Silva de. II. Silva, Elizabeth Ribeiro da. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

BRUNA DA SILVA OLIVEIRA

314/2019
entrada
1º/2017
2017698444

Às oito horas do dia 26 de fevereiro de 2019, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "ESTUDO DO EFEITO DE MODULADORES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM SINTOMAS NÃO MOTORES DA DOENÇA DE PARKINSON", requisito final para obtenção do grau de Mestre em **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Aline Silva de Miranda**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Aline Silva de Miranda	UFMG	APROVADA
Dr. Anderson José Ferreira	UFMG	APROVADA
Dra. Ana Cristina Simões e Silva	UFMG	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: _____

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 26 de fevereiro de 2019.**

Dra. Aline Silva de Miranda (Orientadora) Aline Silva de Miranda

Dr. Anderson José Ferreira Anderson José Ferreira

Dr^a. Ana Cristina Simões Ana Cristina Simões

Silva

Prof. Erika Cristina Jorge
Coordenadora do Programa de Pós Graduação
em Biologia Celular - ICB/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, o qual vem me proporcionando grandes oportunidades de desenvolvimento tanto pessoal quanto profissional.

À minha família, pelo apoio financeiro e emocional, a qual dedico todas as minhas conquistas. Agradeço por todos os ensinamentos e conselhos que me auxiliaram no crescimento pessoal e na formação do meu caráter.

À professora Aline Silva de Miranda pela orientação no projeto. Agradeço por ensinamentos e apoio no desenvolvimento do projeto.

À professora Elizabeth Ribeiro pela co-orientação. Agradeço pelos ensinamentos e apoio no desenvolvimento do projeto,

Aos companheiros e equipes do Laboratório de Neurobiologia “Professora Conceição Machado”, pelos ensinamentos, ajuda, companheirismos durante todo meu percurso no laboratório.

Aos meus amigos, que me apoiaram e aconselharam em momentos difíceis no decorrer do curso.

E a todos os professores que passaram durante a minha formação profissional, que compartilharam seus conhecimentos e experiências

Às agências financiadoras, CAPES, CNPq, Fapemig, que acreditaram e investiram no desenvolvimento do projeto.

EPÍGRAFE

“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar com mais inteligência.”
Henry Ford

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é caracterizada pela perda de 50-70% dos neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra. Embora os achados patológicos sejam bem descritos, a causa da morte neuronal ainda é questão de debate, sendo provavelmente multifatorial. Entre os vários fatores propostos, estudos recentes têm demonstrado a participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) na morte de neurônios dopaminérgicos na DP. Nosso objetivo é investigar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de alterações cognitivas e comportamentais durante a fase pré-clínica da DP, bem como o efeito de estratégias farmacológicas que modulem o SRA na prevenção dessas alterações. Para isso, usamos um modelo experimental de DP por infusão intranasal de MPTP (1mg/narina) em camundongos C57BL/6. Nesse estudo, os camundongos (8-10 semanas) foram organizados em 6 grupos de acordo com o tratamento recebido antes da infusão com MPTP: Salina+Salina (controle), Salina+MPTP, Perindopril (inibidor da ECA) +MPTP, Telmizartan (inibidor do receptor AT1) +MPTP, AVE0991(agonista do receptor Mas) +MPTP. Cada tratamento iniciou-se 5 dias antes da infusão com o MPTP e continuou até o 11° dia após a infusão (dpi), dia da eutanásia. Foram realizados testes comportamentais padronizados e ensaios imunológicos na substância negra, no estriado e hipocampo. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com o AVE0991 protegeu a perda da memória olfatória no 5° dpi. Além do mais, o tratamento com o AVE0991 também protegeu o animal do comportamento do tipo ansioso nos 6° e 11° dpi. Entretanto, não foram encontradas alterações nas atividades locomotoras, memória de trabalho e comportamento do tipo depressivo. Por sua vez, a infusão de MPTP não foi capaz de alterar drasticamente os níveis dos componentes do SRA. Por outro lado, o tratamento com o AVE0991 aumentou as concentrações de ECA2 no estriado e de AngII e Ang (1-7) na substância negra. O AVE0991 reduziu ainda as concentrações de AngII e Ang (1-7) no hipocampo e de ECA1 na substância negra. Contudo, concluímos que potencializar o eixo contra regulatório do SRA pode constituir uma estratégia neuroprotetora promissora para minimizar ou prevenir os sinais pré-clínicos da DP, tais como a perda da memória olfatória e a ansiedade.

Palavras Chaves: Doença de Parkinson, MPTP, Sistema Renina Angiotensina, Ansiedade, Memória Olfatória, Depressão

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the loss of 50-70% of dopaminergic neurons in the compact part of the substantia nigra. Although the pathological aspects are well described, the dopaminergic neuron death is still a subject of debate, and it is probably multifactorial. Among the several factors, some studies have shown the role of the Renin-Angiotensin System (RAS) in the death of dopaminergic neurons in PD. Herein, we aimed to investigate the mechanisms related to the development of cognitive and behavioural changes during a preclinical phase of PD as well as the effects of pharmacological strategies able to modulate RAS on those changes. Then, we used an experimental model of DP induced by intranasal infusion of the neurotoxin MPTP (1mg/nostril) in C57BL/6 mice aged 8-10 weeks. In this study, the animals were divided in 6 groups: SAL+SAL (control), SAL+MPTP (MPTP-mice received saline), Telmizartan (an antagonist of AT1 receptors)+MPTP and AVE099 (an agonist of Mas receptors)+MPTP. Each treatments initiated 5 days before the MPTP infusion and remained until the 11th-day post-infusion. Standardized behavioural tests and immune assays were performed in key areas of PD, including substantia nigra, striatum and hippocampus. The treatment with AVE099 prevented olfactory memory loss at 5 days post-MPTP-infusion. Interestingly, AVE099 also prevented anxiety-like behaviour at 6 and 11 days post-MPTP- infusion. No significant differences were found in locomotor activity, work memory or in depressive-like behaviour. In addition, MPTP was not able to dramatically alter the components of RAS, such as Angiotensin II (AngII), Angiotensin (1-7) (Ang (1-7)), Angiotensinogen Converting Enzyme (ACE), Angiotensinogen Converting Enzyme 2 (ACE2) of DP in the 11th-day post infusion. On the other hand, the treatment with AVE0991 increased the levels of ACE2 in the striatum, and increased AngII and Ang (1-7) in the substantia nigra. However, decreased the levels of AngII and Ang (1-7) in the hippocampus and ACE in the substantia nigra. Therefore, our result suggests that the potentiation of the contra-regulatory axis of the renin-angiotensin system might play a crucial role in the neuroprotection of the pre-clinical signs of PD, including loss of olfactory memory and anxiety.

Key-words: Parkinson's disease; Renin-Angiotensin System; Anxiety-like behavior; Olfactory Memory; MPTP; Depression.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP - Doença de Parkinson

CL – Corpos de Lewy

SNpc - Substância Negra *pars compacta*

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

MPP + - 1-metil-4-phenilpridinio

SRA – Sistema Renina Angiotensina

Ang – Angiotensina

DAT – Transportador de dopamina

ECA1 – Enzima conversora de angiotensinogênio 1

ECA2 – Enzima conversora de angiotensinogênio 2

AT1 – Receptor de Angiotensina tipo 1

AT2 - Receptor de Angiotensina tipo 2

BRA1 - Bloqueadores do receptor de angiotensina

Dpi – dias pós infusão

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	10
2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Doença de Parkinson.....	11
2.1.1 Aspectos Gerais da Doença de Parkinson.....	11
2.1.2 Epidemiologia da Doença de Parkinson.....	12
2.1.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson.....	14
2.2 Modelos animais de Doença de Parkinson.....	16
2.2.2 Modelo experimental de doença de Parkinson por administração de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina – MPTP.....	17
2.3 Sistema Renina Angiotensina.....	18
2.3.1 Sistema Renina Angiotensina no Sistema Nervoso Central.....	19
2.4 Moduladores do Sistema Renina - Angiotensina.....	22
2.5 Tratamentos utilizados na Doença de Parkinson.....	23
2.6 Doença de Parkinson e o Sistema Renina Angiotensina.....	24
3.0 JUSTIFICATIVA.....	26
4.0 HIPÓTESE.....	27
5.0 OBJETIVOS.....	28
5.1 Objetivo Geral.....	28
5.2 Objetivos específicos.....	28
6.0 MATERIAS E MÉTODOS.....	29
6.1 Animais.....	29
6.2 Modelo Murino de Doença de Parkinson.....	29
6.3 Tratamento.....	30
6.4 Teste de Campo Aberto.....	30
6.5 Teste de reconhecimento olfatório discriminativo.....	31
6.6 Labirinto em Y.....	32
6.7 Nado forçado.....	32
6.8 Medida dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) por ensaio imunoenzimático (ELISA).....	33
6.9 Análise estatística.....	33
7.0 RESULTADO.....	34
7.1 Tratamento com o AVE0991 protegeu contra a perda olfatória 5 dias após a infusão intranasal (dpi) com MPTP.....	34
7.2 Infusão intranasal de MPTP não está associada com alterações locomotoras.....	35
7.3 Tratamento com AVE0991 reverteu o comportamento do tipo ansioso nos animais no 11º dpi no Teste de Campo Aberto.....	36
7.4 Infusão com MPTP não alterou a memória de trabalho.....	37
7.5 A infusão com MPTP não induziu comportamento do tipo depressivo.....	37
7.6. Análise da concentração de componentes do Sistema Renina Angiotensina em regiões relevantes na Doença de Parkinson.....	38
7.6.1 Estriado.....	38
7.6.2 Substância Negra.....	40

7.6.3 Hipocampo.....	42
8.0 Discussão.....	45
9.0 Conclusão.....	50
10. Perspectivas Futuras.....	51
11.0 Referências.....	53
12.0 Apêndice.....	62

1.0 INTRODUÇÃO

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum, acometendo principalmente indivíduos com mais de 55 anos (Radhakrishnan et. al, 2018). A DP é definida pela perda ou degeneração de 50-70% de neurônios dopaminérgicos na substância negra *pars compacta* (SNpc), por uma perda significativa de dopamina no estriado e pela presença de Corpos de Lewy (CL), inclusões citoplasmáticas formadas principalmente por α -sinucleína e ubiquitina, nos neurônios dopaminérgicos (Jellinger et. al., 2012).

As causas que levam a perda ou a degeneração dos neurônios dopaminérgicos permanecem desconhecidas, porém há evidências que levam a acreditar que resulte da interação de um conjunto de fatores, entre eles: fatores genéticos, ambientais, estresse oxidativo, anormalidades mitocondriais, inflamação e/ou alterações do envelhecimento (Pereira D et. al., 2010). Ocorre a aceleração da perda dos neurônios dopaminérgicos com o passar dos anos (Rebelatto, et. al., 2006).

Entre vários fatores, estudos recentes têm proposto a participação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) na morte de neurônios dopaminérgicos observada na DP. O SRA é filogeneticamente um dos sistemas hormonais mais antigos, conhecido por regular a pressão sanguínea e o equilíbrio eletrolítico do organismo, sendo essencial para a manutenção da homeostase (Lev-Ran and Porta et. al., 2005). Apesar de seus componentes não serem capazes de ultrapassar a barreira hematoencefálica, estudos têm demonstrado que neurônios e micróglia são capazes de produzi-los localmente no sistema nervoso central (Stornetta et. al., 1988; Milsted et. al., 1990; Kumar et. al., 1988; Thomas et. al., 1992).

Apesar de os estudos clínicos ainda serem escassos, há evidências de que pacientes que utilizam os moduladores do RAS apresentam retardo na progressão dos sintomas da DP (Reardon et. al., 2000). Nesse trabalho, tivemos como objetivo investigar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de alterações cognitivas e comportamentais durante a fase pré-clínica da DP, utilizando o modelo de infusão intranasal de MPTP em camundongos, bem como avaliar o efeito de estratégias farmacológicas que modulam o SRA na prevenção dessas alterações.

2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doença de Parkinson

2.1.1 Aspectos Gerais da Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em indivíduos com mais de 55 anos, perdendo apenas para a Doença de Alzheimer (Radhakrishnan et. al, 2018). O diagnóstico da DP é clínico e se baseia na presença de sinais e sintomas típicos da doença e na exclusão de outras causas de parkinsonismo. O diagnóstico definitivo, no entanto, somente é possível por meio da realização de exame *postmortem*, baseado nas características fisiopatológicas da doença. Patologicamente, a DP é caracterizada pela perda progressiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) e pela presença de corpos de Lewy (CL), inclusões intracitoplasmáticas da proteína α -sinucleína) nos neurônios remanescentes (Abdula et. al, 2015).

A DP tem sido reconhecida desde o início do século XIX, quando o médico inglês James Parkinson a descreveu, em 1817, como “paralisia agitante”, por apresentar, entre outros sintomas, tremor em repouso. Posteriormente, em 1925, Brissau propôs uma associação dos sintomas com o acometimento das áreas do mesencéfalo ventral dos pacientes (Goetz et. al., 2011).

Os sintomas clássicos para o diagnóstico da DP são: tremor de repouso, rigidez, bradicinesia, instabilidade postural e marcha festinante. Há evidências de que os sintomas aparecem quando há cerca de 50-70% de degeneração dos neurônios dopaminérgicos da SNpc (Przedborski et. al., 2000; Jankovic et. al., 2008; Hornykiewicz et. al., 2008). Recentemente, estudos têm demonstrado que vários sintomas não motores podem estar associados a DP, tais como constipação, diminuição do olfato, distúrbios do sono, dor, depressão e transtornos de ansiedade. Os sintomas não motores podem anteceder, de cinco a vinte cinco anos o início dos déficits motores clássicos da DP (Ferrer et. al., 2011; Savica et. al., 2010, Poewe et. al., 2008), caracterizando uma fase denominada de pré-clínica da doença. A perda da olfação é um dos sintomas mais comuns e característico da fase não motora da doença, com uma prevalência de 50-90% dos casos (Boesveldt et. al., 2008; Ponsen et. al., 2004).

2.1.2 Epidemiologia da Doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em indivíduos idosos, sendo menos prevalente apenas que a Doença de Alzheimer. Estima-se que 1 a 2 indivíduos a cada 100.000 habitantes desenvolvam a doença por ano e sua prevalência varia entre 100 a 300 por 100.000 indivíduos na população (Tysnes et. al., 2017). No entanto, devido ao envelhecimento da população em geral, estima-se que o número de pacientes com DP dobre até 2030 (Elbaz et. al., 2016).

No Brasil, a prevalência da DP, de acordo com o censo 2000 do IBGE, é de 700/100.000 indivíduos com idade entre 60-69 anos, e de 1500/100.000 indivíduos com idade entre 70-79 anos. No entanto, 10% dos pacientes possuem menos de 50 anos de idade. Além disso, cerca de 36 mil novos casos são estimados por ano (Souza et. al., 2011).

Hirsch e colaboradores (2016), ao analisarem as taxas de incidência da DP utilizando de revisões literárias e metanálises, concluíram que a incidência da doença aumenta com o avançar da idade em homens e mulheres. Em mulheres, a taxa de incidência aumenta de 3,26/100.000 pessoas ao ano com idade de 40-49 anos para 103,48/100.000 pessoas por ano com idade acima 80 anos, sendo que o pico ocorre aos 70-79 anos de idade. Entretanto, em homens, a taxa de incidência aumenta de 3,57/100.000 pessoas por ano na idade de 40-49 anos para uma taxa de 258,47/100.000 pessoa por ano com idade acima de 80 anos.

Os neurônios da SNpc distinguem-se não apenas por sua pigmentação característica, mas também por exibirem produção elevada de espécies reativas de oxigênio devido ao metabolismo da dopamina (Reeve et. al., 2014). Admite-se que essa peculiaridade metabólica torna esses neurônios mais susceptíveis ao envelhecimento, o que poderia explicar o aumento da incidência a DP com a idade.

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. No entanto, uma revisão sistemática dos estudos de prevalência de DP encontrou diferenças significativas entre os gêneros apenas na faixa de 50 a 59 anos de idade (Storstein et al, 2017), sem diferença significativa na prevalência quando estratificada por localização geográfica.

As causas da DP permanecem desconhecidas, porém há evidências que levam a acreditar que resulte da interação de um conjunto de fatores, entre eles: fatores genéticos, ambientais, estresse oxidativo, anormalidades mitocondriais, inflamação e/ou alterações do envelhecimento (Pereira et. al., 2010), como a aceleração da perda dos neurônios dopaminérgicos com o passar dos anos

(Rebelatto et. al., 2006). Apenas 10% dos casos são devidos a mutações genéticas (Hindle et. al., 2010).

2.1.3 Fisiopatologia da Doença de Parkinson

A DP é definida patologicamente pela perda ou degeneração de 50-70% de neurônios dopaminérgicos na SNpc, por uma perda significativa de dopamina no estriado e pela presença de CL, inclusões citoplasmáticas formadas principalmente por α -sinucleína e ubiquitina, nos neurônios dopaminérgicos (Jellinger et. al., 2012).

A SNpc é uma área responsável pelo controle e refinamento do movimento mediante a projeção de axônios dopaminérgicos excitatórios para o córtex primário motor, o estriado, núcleo putâmen e globo pálido, modulando assim os núcleos importantes no movimento voluntário (Keath et. al., 2007). A perda dos neurônios dopaminérgicos da SNpc compromete a via nigroestriatal, com consequente diminuição dos níveis de dopamina no estriado (Fig. 1). Além disso, ocorre redução dos níveis de acetilcolina, glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA) no núcleo subtalâmico, tálamo e córtex, regiões relacionadas à sintomatologia da DP (Wichmann & De Long et. al., 2003).

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).

Como mencionado anteriormente, existe uma relação direta entre a idade e a ocorrência da doença (Caslake et. al., 2013; Elbaz et. al. 2010). O envelhecimento traz consigo mudanças fisiológicas que são, muitas vezes, determinadas pelo estilo de vida, ambiente, pela alimentação, genética, entre outros fatores. Estudos têm

demonstrado que o sistema imunológico sofre modificações no envelhecimento entrando em um estado tipo “inflammaging” (Franceschi et. al., 2000). No decorrer da vida agentes estressores endógenos e exógenos podem estimular respostas adaptativas locais e sistêmicas, incluindo ativação do sistema imune, ocorrendo uma “inflamação fisiológica” (Ottaviani et. al., 1998). Usualmente, existe um balanço fisiológico entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias. Entretanto, com o decorrer da idade, pode ocorrer um desequilíbrio dessas citocinas, tornando a pessoa mais susceptível a inflamações (Monti et. al., 2016). Franceschi et. al.(2014) sugerem uma correlação entre inflamação e doenças neurodegenerativas.

Alguns autores admitem que a liberação de uma pequena quantidade de

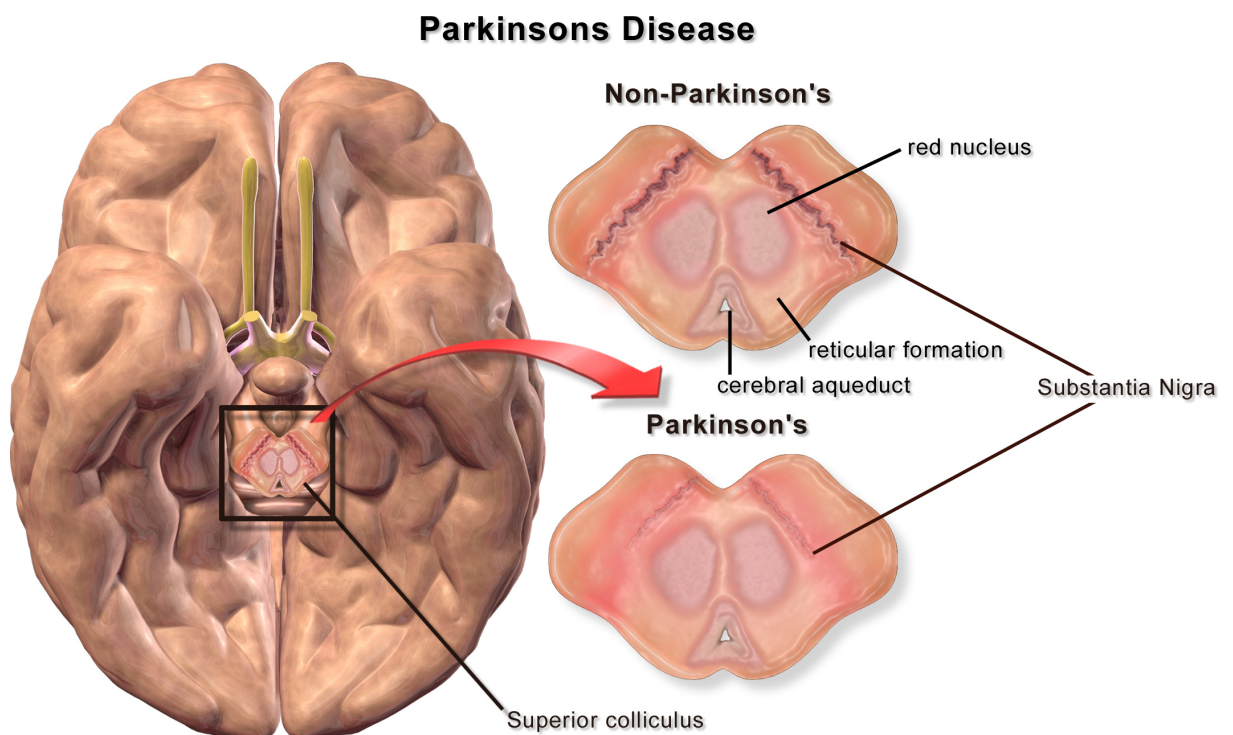


Figura 1: Neuropatologia da DP. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal no contexto fisiológico. (B) Representação esquemática da via nigroestriatal degenerada na DP. (Adaptado Kandel, 2000)

α -sinucleína, junto com esse estado *inflammaging*, pode ativar a micróglia e gerar uma inflamação exacerbada, o que poderia ser o gatilho da DP. A toxicidade

causada pelo aumento de α -sinucleína precede a formação de grandes agregados ou fibrilas (Kalia et. al., 2013). Portanto, o aumento desta proteína interfere em muitas funções intracelulares, principalmente na homeostase vesicular e transporte neuronal (Brendor et. al., 2013; Hun et. al., 2015). Ressalta-se ainda que astrócitos imunorreativos, contendo inclusões de α -sinucleína, são encontrados na DP (D'Agostinho et. al., 2012)

2.2 Modelos animais de Doença de Parkinson

Os modelos animais de DP podem ser divididos em duas categorias: modelos genéticos e neurotóxicos. Cada grupo possui vantagens e desvantagens. Uma vantagem dos modelos neurotóxicos é que se baseiam principalmente em alvos moleculares potencialmente capazes de causar a DP em humanos (Bezard et. al., 2011). Entretanto, os modelos genéticos disponíveis atualmente não apresentam fenótipos de neurodegeneração característicos da doença (Dawson et al. 2010). As limitações dos modelos genéticos podem ser superadas com a utilização de modelos neurotóxicos, os quais empregam diferentes tipos de moléculas para ocasionar lesões na via nigroestriatal, facilitando assim novos estudos.

Diferentes drogas, tais como 6-Hydroxydopamina (6-OHDA), Rotenona, 1-metil-4-phenil-1,2,3,6-tetrahydropyridina (MPTP), paraquat (PQ) administradas

por diferentes vias - intranasal, intracranial, intraperitoneal, entre outras -

Modelos	Patologia					Fenótipos comportamentais	
	Danos Nigroestriatal					Motores	Não motores
	Corpo celular SN	Terminal estriatal	Dopamina estriatal	Extranigral patologias	Corpos Levy		
6-OHDA							
Rato							
Injeção intracranial (Substancia Negra, Estriado, Mesencefalo ventral)	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Desordem Cognitivas, psiquiátricas e gastrointestinais
MPTP							
Primatas não humanos (i.p,i.m,infusão intracrotidial)	Sim	Sim	Sim	LC	Sim	Sim	Numerosos veja Brotchie2010; Bezard2011
Mouse							
Agudo, subagudo (i.p)	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Sim	Aumento transitório da motilidade do colón
Crônico (minibombas osmótica)	Sim	Sim	Sim	LC	Sim	Sim	ND
PQ							
Mouse i.p	Sim	Conflito	Não	LC	Sim	ND	ND
PQ/Maneb							
Mouse i.p	Sim	ND	Sim	ND	Sim	ND	ND
Rotenona							
Rato							
Infusão por mini bomba osmotica i.p	Sim	Sim	Sim	ND	Sim	Sim	Diminuição motilidade gastrointestinal
i.p	Sim	Sim	Sim	GI	Sim	Sim	Diminuição motilidade gastrointestinal

Abreviações: LC, locus coeruleus; ND, não determinado; i.p, intraperitoneal; PQ, parasquat; GI, gastrointestinal

Figura 2: Modelos experimentais neurotóxicos utilizados para o estudo de DP (Adaptado de Kim Tieu et al., 2012).

são usadas em modelos experimentais para estudo dos fenótipos da DP. A figura 2 mostra vantagens e desvantagens de alguns desses modelos.

2.2.2 Modelo experimental de doença de Parkinson por administração de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina – MPTP

O 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) foi descoberto como uma neurotoxina em 1983, quando um grupo de jovens dependentes de drogas desenvolveu um quadro semelhante a DP grave. A síndrome ocorreu quando eles utilizaram um análogo da heroína sintética que continha como contaminante o MPTP (Langston et. al., 1983).

O MPTP é uma substância lipossolúvel que ultrapassa a barreira hemato-encefálica. No encéfalo, é rapidamente metabolizado pelas células da glia e transformado em 1-metil-4-phenylpyridinium (MPP⁺). O MPP⁺ depende de carreadores para ultrapassar a membrana plasmática, uma vez que é uma molécula altamente polar. Porém, o MPP⁺ é um substrato de alta afinidade para os transportadores de dopamina (DAT) (Przedborski *et. al.* 2001; Dauer *et. al.*, 2003). Uma vez dentro dos neurônios dopaminérgicos, o MPP⁺ se acumula dentro das mitocôndrias, bloqueando o complexo I da cadeia respiratória. Essa perturbação ocasiona uma maior produção dos radicais oxidativos e diminui a síntese de ATP, comprometendo o aporte energético e levando à morte celular (Dauer *et al.*, 2003).

O MPTP, quando administrado em primatas e humanos, leva a síndrome parkinsoniana grave e irreversível, com sintomas clássicos da doença. Estudos prévios mostraram que, além dos sinais motores clássicos, o MPTP, dependendo da via de administração e dose, pode induzir prejuízos cognitivos e comportamentais similares aos encontrados na DP, constituindo um modelo promissor para o estudo da fase pré-clínica da doença (Da Cunha *et. al.*, 2001; Perry *et al.*, 2004).

2.3 Sistema Renina Angiotensina

O Sistema Renina Angiotensina (SRA) é filogeneticamente um dos sistemas hormonais mais antigos, conhecido por regular a pressão sanguínea e o equilíbrio eletrolítico do organismo, sendo essencial para a manutenção da homeostase (Lev-Ran *et. al.*, 2005).

O componente ativo do SRA é a Angiotensina II (Ang II), a qual é formada pela clivagem da Ang I pela enzima conversora de angiotensina (ECA). Por sua vez, a Ang I resulta da modificação do Angiotensinogênio pela ação da enzima renina. A

Ang II liga-se aos receptores de Angiotensina do tipo I e II (AT1, AT2) (Gismond et al., 2011).

Os receptores AT1 e AT2 geralmente possuem efeitos opostos nas células, ou seja, enquanto a ativação do receptor do tipo AT1 promove vasoconstrição, crescimento celular e proliferação, a ativação do receptor do AT2 promove ação de vasodilatação, efeitos anti-crescimento e apoptose. (Chabrashvili et. al., 2003; Jones et. al., 2008). Alguns dados demonstram que a interação entre esses receptores é complexa e requer mais estudos para sua compreensão.

Atualmente, sabe-se que outros componentes do SRA desempenham papel importante na homeostase corporal. Um desses novos componentes é um homólogo da ECA, conhecido como enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), encontrada em diversos tipos de tecidos, inclusive no encéfalo (Bacani et. al., 2006; Hamming et. al., 2007). Esta enzima converte Ang II em Ang (1-7). (Fig:3)

A Ang (1-7) atua diretamente em um receptor conhecido como receptor Mas, associado à proteína G, que em geral medeia os efeitos opostos aos da ativação do receptor AT1 (Clark et. al., 2001; Kostenis et. al., 2005). Além disso, o receptor Mas é caracterizado como um receptor oncogênico, por influenciar na diferenciação e no crescimento celular durante o desenvolvimento fetal (Hanley et. al., 1990).

2.3.1 Sistema Renina Angiotensina no Sistema Nervoso Central

Por muitos anos o SRA foi considerado um sistema hormonal circulante, com funções de regulação da pressão sanguínea e equilíbrio osmótico. Apesar da Ang II não ultrapassar a barreira hematoencefálica, os componentes do SRA são encontrados no Sistema Nervoso Central. Atualmente, estudos mostram que neurônios e micróglia são capazes de produzi-los localmente em diversas regiões do encéfalo (Stornetta et. al., 1988; Milsted et. al., 1990; Kumar et. al., 1988; Thomas et.

al., 1992). Entretanto, como citado anteriormente, compreender o SRA é mais complexo do que se pensava. A ação do SRA não está mais limitada ao controle da pressão sanguínea e balanço eletrolítico. Algumas evidências apontam o papel do SRA em diferentes funções cerebrais, como memória e aprendizagem (Walte et. al., 1998; Lazzaroni et. al., 2012), controle motor e emocional (Paul et. al., 2006), entre outras.

Nos núcleos da base, os componentes do SRA estão presentes principalmente na região nigroestriatal do sistema dopaminérgico. Rodriguez-Pallares e colaboradores (2008), utilizando microscopia confocal e técnicas de hibridização, mostraram que, na substância negra de ratos, os receptores AT1 e AT2 estão presentes nos neurônios dopaminérgicos, astrócitos e micróglia. Em 2013, Garrido e colaboradores demonstraram a sua presença na substância negra de humanos.

Como descrito anteriormente, o SRA é um dos principais sistemas regulatórios da homeostase do corpo, com a ativação da Ang II e estimulação do receptor AT1, expresso em vários órgãos, inclusive no cérebro. Os receptores AT1 são altamente expressos em células endoteliais cerebrovasculares, o que explica como a Ang II circulante estimula o receptor AT1, controlando, assim, o fluido cerebrovascular (Saavedra et. al., 1992; Zhou et. al., 2006). Além disso, os receptores AT1 encontram-se em alguns circuitos neuronais, tais como o nigroestriatal, na micróglia (Phipps et. al., 2018) e em astrócitos (Lanz et. al., 2010).

A Ang II pode desempenhar um papel importante em alterações patológicas dos tecidos onde atua (Ruiz-Ortega et. al., 2001; Suzuki et. al., 2003). Estudos recentes têm demonstrado que um aumento na produção local de Ang II pode

induzir lesões teciduais, por meio de aumento do estresse oxidativo e da inflamação (Zalbaetal et. al., 2001; Touyz et. al., 2004; Hoogwerf et. al., 2010). Não obstante, no tecido nervoso, aumento da Ang II pode induzir lesões devido ao aumento do estresse oxidativo, por meio da ativação dos receptores AT1 e, assim, ativação do complexo oxidativo NADPH (CON) (Touyz et.al., 2004; Garrido et.al., 2009), uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio, perdendo apenas para a produção mitocondrial (Babior et. al., 1999, 2004; Cai et. al., 2005). Além disso, a Ang II pode ativar diretamente a produção de algumas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF e IL-1 β , de modo que tais citocinas agirão nas células inflamatórias induzindo uma resposta imune, podendo, assim, desencadear uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e ativação mitocondrial (Abdul-Muneer et. al., 2017).

Um outro importante componente do SRA encontrado no SNC é a Ang (1-7). A Ang (1-7) atua ativando os receptores Mas, o qual possui efeitos fisiológicos que são considerados como ações opostas às da ativação dos receptores AT1 pela Ang II, ou seja, a Ang (1-7) apresenta um efeito contra regulatório do eixo clássico do SRA (Santos et. al., 2003). Contudo, entre os efeitos do eixo Ang (1-7) e receptor Mas no sistema nervoso, um efeito importante está na inibição do eixo clássico do SRA (Jiang et. al, 2013), de modo que ocorre uma diminuição na produção de espécie reativas de oxigênio. Portanto, o Ang (1-7) pode ter um papel fundamental nas ações anti-inflamatórias em doenças, tais como obesidade, arteriosclerose, resistência à insulina, entre outras (Rodrigues Prestes et al., 2017).

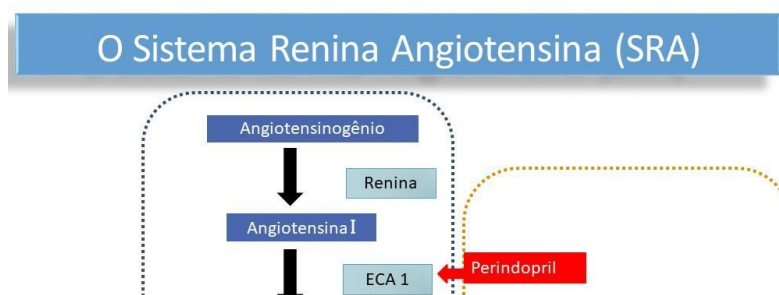


Figura 3: Cascata simplificada do sistema renina angiotensina. ACE, enzima conversora de angiotensina; AT1R, receptor de Ang II do tipo 1; AT2R, receptor de Ang II do tipo 2; MasR, receptor Mas de Ang- (1-7). (Modificado de Arroja et al. 2016).

2.4 Moduladores do Sistema Renina - Angiotensina

Bloqueadores dos receptores de angiotensina II (BRAs) foram desenvolvidos para o controle da pressão arterial, a qual está associada a uma excessiva ativação dos receptores AT1. Além desse controle, o uso desses bloqueadores reduz a inflamação periférica podendo gerar efeitos benéficos ao metabolismo (Ismail et. al., 2010).

Os BRAs são potenciais agentes neuroprotetores. A ativação dos receptores AT1 induzem processos patológicos, tais como aumento da permeabilidade vascular e inflamação, o que conseqüentemente pode induzir condições de hipóxia, redução do fornecimento de nutriente e lesão celular. Contudo, essas associações explicam como a hipertensão, doenças renais, e desordens metabólicas podem afetar o cérebro. Como resultado, essas condições são reconhecidas como fatores de risco para as doenças neurodegenerativas, tais como Alzheimer e DP. Portanto, os BRAs protegem não só a vascularização periférica e central, como reduzem a hipóxia e diminuem os processos inflamatórios em órgãos periféricos e no encéfalo. (Saavedra et. al., 2012; Nelson e.t al.,2014).

Um dos inibidores do SRA é o Telmisartan. O Telmisartan é um antagonista não peptídico seletivo do receptor do subtipo AT1 da Ang II e foi desenvolvido para o tratamento da hipertensão, de modo que ele a controla sem afetar outros sistemas de receptores envolvidos na regulação cardiovascular (McClellan et. al., 1998).

Já o Perindopril é um inibidor indireto dos receptores AT1, uma vez que, atua inibindo a ação da ECA1. Esse BRA foi estudado em indivíduos jovens e saudáveis e em pacientes com hipertensão. Esta droga é um éster na sua forma pró-droga e é convertida em sua forma ativa, o perindoprilato, por hidrólise no fígado (Tsai et al., 1989).

Já o AVE0991 é um composto não peptídico análogo a Ang(1-7). Este composto é um agonista do receptor Mas da Ang(1-7) que quando ativo mimetiza os efeitos dessa angiotensina. Ele age, em muitos tecidos, deslocando a via SRA convencional para o eixo contra regulatória através da ativação dos receptores Mas (Santos et al., 2006). Além disso, a Ang(1-7) tem um papel importante como regulador dos processos inflamatórios, pois desempenha funções na diminuição da liberação de citocinas, na atração de leucócito e nos danos dos tecidos por formação de fibrose (Grobe et al., 2006).

2.5 Tratamentos utilizados na Doença de Parkinson

A partir dos anos 60, a reposição da dopamina tem sido realizada, através de doses de seu precursor L-Di-hidroxifenilalanina (L-Dopa), para o controle dos sintomas motores da DP (Birkmayer et al., 1961). Apesar da descoberta de novas drogas, tais como inibidores da recaptção de dopamina, que modulam este sistema dopaminérgico, o tratamento com a L-Dopa permanece como o tratamento prioritário da DP.

Dessa forma, os tratamentos disponíveis hoje para DP aliviam apenas os sintomas. Com o avançar da doença, a perda dos neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal gera a diminuição da capacidade de armazenamento da L-Dopa, intensificando, por conseguinte, o declínio da dopamina. Consequentemente, os

efeitos da droga têm, ao longo do tempo, menor durabilidade, ou seja, o paciente requer doses cada vez mais altas com a progressão da doença. (Wolfgang et. al., 2017).

Já para os sintomas não motores da DP, não existe um tratamento específico. Portanto, é muito comum a utilização de fármacos para tratar sintomas isolados, tais como antidepressivos para depressão e ansiolíticos no caso de quadros de ansiedade (Barbara et. al., 2018).

2.6 Doença de Parkinson e o Sistema Renina Angiotensina

Na DP, existem diversos fatores que parecem contribuir para a morte neuronal, no entanto, nos últimos anos, os processos inflamatórios e o estresse oxidativo têm sido os mais estudados. Alguns estudos demonstram que a estimulação do receptor AT1 ativa oxidases dependentes de NADPH, uma fonte importante de espécies reativas de oxigênio (Griendling et al., 2000; Chabrashvili et al., 2003; Rodriguez-Pallares et al., 2008). Além do mais, a Ang II é um componente pró-inflamatório (Suzuki et al., 2000), criando a possibilidade de diminuir a progressão da DP através da manipulação do SRA.

Em estudos *post-mortem* com pacientes com DP foi encontrada uma grande redução da densidade de receptores AT1 nos núcleos caudado e putâmen e na SNpc, em relação a paciente sem DP, sugerindo que este receptor estaria presente predominantemente em neurônios dopaminérgicos. Adicionalmente, estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a liberação de dopamina no estriado pode ser modulada pelo receptor AT1, evidenciando a interação entre o RAS e o sistema dopaminérgico central (Mendelsohn et al., 1993; Brown et al., 1996; Ge e Barnes, 1996; Jenkins et al., 1997).

Consequentemente, o uso de BRA tem se demonstrado promissores como possíveis adjuvantes no tratamento de pacientes com DP. Estudos clínicos têm demonstrado que pacientes que utilizam os moduladores do SRA apresentam um retardo na progressão dos sintomas da DP (Reardon et. al., 2000). Além do mais, estudos tais como os de Sonsalla e colaboradores 2013, têm demonstrado que a inibição do eixo clássico do SRA confere uma maior sobrevivência aos neurônios dopaminérgicos em modelo animal de parkinsonismo.

Embora evidências suportem o envolvimento do eixo clássico do SRA na DP, há pouco ou nenhum estudo que investigou o papel do eixo contra regulatório, particularmente sua associação com o sistema imune, nessa condição.

3.0 JUSTIFICATIVA

A DP é uma condição neurodegenerativa na qual os mecanismos envolvidos na morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc 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. Nesse contexto, pretendemos buscar por alterações nos componentes do SRA na DP, com enfoque na regulação do sistema imune e associação com o desenvolvimento dos sintomas não motores da doença. Há poucos estudos relacionando o SRA, regulação do sistema imune e o desenvolvimento dos sintomas da DP em modelos experimentais. O conhecimento acerca do processo neuroinflamatório e o SRA na DP também é bastante restrito. Portanto, acreditamos que essa abordagem auxiliará na compreensão da fisiopatologia da DP associada aos sinais não motores e, possivelmente, na detecção de potenciais alternativas terapêuticas.

4.0 HIPÓTESE

O efeito neuroprotetor dos moduladores do SRA se dá pela potencialização do eixo contra regulatório, e não apenas pelo bloqueio do eixo clássico.

5.0 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento de alterações cognitivas e comportamentais durante a fase pré-clínica da DP, utilizando o modelo de infusão intranasal de MPTP em camundongos, bem como o efeito de estratégias farmacológicas que modulam o Sistema Renina Angiotensina na prevenção dessas alterações.

5.2 Objetivos específicos

– Avaliar a presença de sintomas não motores em modelo experimental de parkinsonismo por infusão intranasal de MPTP.

– Avaliar a expressão dos componentes do SRA no estriado, mesencéfalo ventral e hipocampo de camundongos C57BL/6 submetidos a infusão intranasal com MPTP.

– Investigar o efeito dos moduladores do SRA, Telmisartan, Perindopril e AVE0991, como potenciais estratégias terapêuticas aos sintomas não motores da DP.

6.0 MATERIAS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 selvagens, com a idade de 8-10 semanas e peso corporal entre 22-27 g, distribuídos em 5 grupos distintos de acordo com tratamento prévio à infusão com MPTP:

- Controle (Salina), com infusão intranasal de salina (SAL);
- Salina, com infusão intranasal de MPTP (MPTP);
- Telmisartan (10mg/kg) com infusão intranasal de MPTP (TEL);
- Perindopril (5mg/kg) com infusão intranasal de MPTP (PER);
- AVE0991 (3mg/kg) com infusão intranasal de MPTP (AVE3).

Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos do departamento de Morfologia da UFMG, por todo o período de experimento, com ciclo de iluminação de 12 horas por dia, e com acesso à água e ração. O manejo, uso e procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG sob o número 255/2017 (CEUA-UFMG) (Anexo B).

6.2 Modelo Murino de Doença de Parkinson

A indução do parkinsonismo pela administração de MPTP (1Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, Sigma-Aldrich) foi realizada por via intranasal, em duas doses de 1mg de MPTP em 25 µL de salina, uma dose por narina, sem anestesia. Estabelecemos um intervalo de 4 horas entre as duas doses com o objetivo de reduzir a mortalidade dos animais, conforme previamente descrito por Prediger et al. (2010). Os animais controles receberam duas doses de solução salina estéril, por via intranasal, no mesmo intervalo de tempo utilizado para a administração de MPTP.

6.3 Tratamento

Devido ao seu caráter hidrofóbico, as drogas foram diluídas em polietilenoglicol, e armazenadas em solução estoque, mantida congelada até o momento de uso. Os animais receberam 100 µl da solução com uma das drogas, por gavagem, na dose diária especificada a seguir: Telmisartan (10mg/kg), Perindopril (5mg/Kg) AVE0991 (3mg/kg). Os animais controles receberam o mesmo volume de salina a 0,9% por gavagem. Os tratamentos foram iniciados 5 dias antes da infusão com MPTP e finalizados no dia da eutanásia dos animais, correspondente ao 11º dia após a infusão (dpi) (Fig.4).

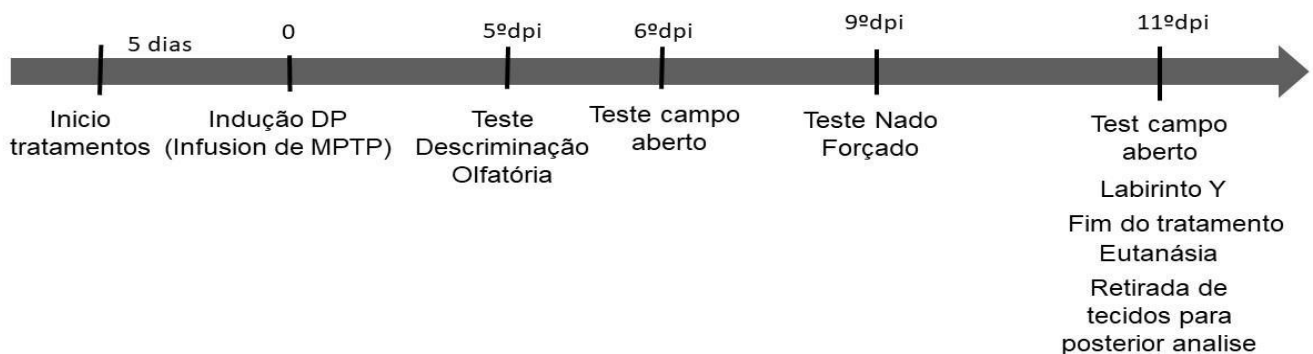


Figura 4: Desenho experimental.

6.4 Teste de Campo Aberto

O teste comportamental denominado Campo Aberto é utilizado em estudos experimentais para investigar simultaneamente a atividade locomotora e exploratória bem como níveis de ansiedade (Podhorna & Brown, 2002). É um método válido e amplamente empregado na avaliação de parâmetros comportamentais em modelos experimentais de diversas doenças humanas (Takahashi et al., 2006). O teste foi realizado no 6º e 11º dpi.

Para aquisição dos dados do Campo Aberto foram utilizadas 4 gaiolas do sistema Phenotyper Noldus, com paredes opacas (30 cm X 30cm) 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. Este sistema permitiu a análise de 4 camundongos simultaneamente, um em cada gaiola. A distância foi mensurada em cm e tempo em segundos (s), o qual foi adquirido pelo software EthoVision. Para iniciar o teste, cada camundongo foi colocado no centro da arena para observação de sua locomoção livre durante dez minutos. Parâmetros como atividade de locomoção, número de entradas no centro da arena e porcentagem de tempo gasto neste local (medida da ansiedade) foram registrados por um software de rastreamento (EthoVision XT, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

A locomoção ou atividade locomotora dos animais foi definida pela distância total percorrida (cm) durante o tempo do teste (dez minutos). 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.

6.5 Teste de 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. Portanto, cada animal foi colocado, por 5 min, em uma caixa dividida 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. O teste foi realizado como previamente descrito por Prediger et al., (2010). Analisamos o tempo de permanência em cada ambiente através do software de rastreamento (EthoVision XT, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA). O teste foi realizado no 5ºdpi

6.6 Labirinto em Y

Para analisar a memória de trabalho consideramos o comportamento de alternância espontânea de uma única sessão do labirinto em Y (Lazaroni et al. 2012). Cada camundongo foi posicionado num braço inicial (A) livre para mover-se pelos outros braços do labirinto durante 5 min. A série de entradas em cada braço foi visualmente analisada. A alternância foi definida como sucessivas entradas nos 3 diferentes braços. O número de sequências de entradas (ABC, BCA) foi definido como o número de alterações. A porcentagem da alternância foi calculada de acordo com a seguinte fórmula: $[\text{total de alternância} / (\text{total de entradas nos braços} - 2) \times 100]$. O teste foi realizado no 11ºdpi.

6.7 Nado forçado

Este teste foi realizado para a detecção de comportamentos do tipo depressivo (Häring et al., 2013). Para o teste do nado forçado os animais foram colocados individualmente em um recipiente de vidro transparente preenchido com 10 cm de água com temperatura de 23-25°C. A sessão teve duração total de 6 minutos, sendo os primeiros 2 minutos de pré-teste seguidos pelo teste de 4 min. O tempo de imobilidade foi registrado e posteriormente analisado por um software de rastreamento (EthoVision XT, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA),

que considerou o animal como imóvel quando estava com sua velocidade abaixo de 5cm/s para assim desconsiderar o tempo em que o animal estava apenas boiando. O teste foi realizado no 9º dpi.

6.8 Medida dos componentes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) por ensaio imunoenzimático (ELISA)

A quantificação de componentes do SRA (Ang II, Ang (1-7), ECA, ECA2) foi feita por ELISA, conforme instruções do fabricante do kit Quantikine (MyBioSource®, San Diego, CA, EUA) no comprimento de onda de 450 nm.

6.9 Análise estatística.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Os dados foram relatados de forma descritiva utilizando-se as medidas de tendência central de dispersão média e desvio padrão e/ou mediana e intervalo interquartil. Os resultados foram analisados quanto a distribuição normal pelo teste Kolmorov-Smirnov. As variáveis com distribuição normal foram comparadas por meio dos testes estatísticos t- student (duas variáveis) ou ANOVA (três ou mais variáveis). O pós-teste de Bonferroni foi utilizado quando necessário para múltiplas comparações. No caso de distribuição não normal, as variáveis foram comparadas por meio dos testes estatísticos Mann-Whitney U (duas variáveis) ou Kruskal-Wallis (três ou mais variáveis). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0.05$.

7.0 RESULTADO

7.1 Tratamento com o AVE0991 protegeu contra a perda olfatória 5 dias após a infusão intranasal (dpi) com MPTP.

Nossos resultados

Mostraram que, no 5° dia após infusão de MPTP, os animais apresentaram déficit no reconhecimento olfatório, que se agravou com o tratamento com inibidor da ECA, o Perindopril. Entretanto, os animais submetidos ao tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE0991, não apresentaram danos olfatórios no 5° dpi, indicando um papel protetor (Fig. 5).

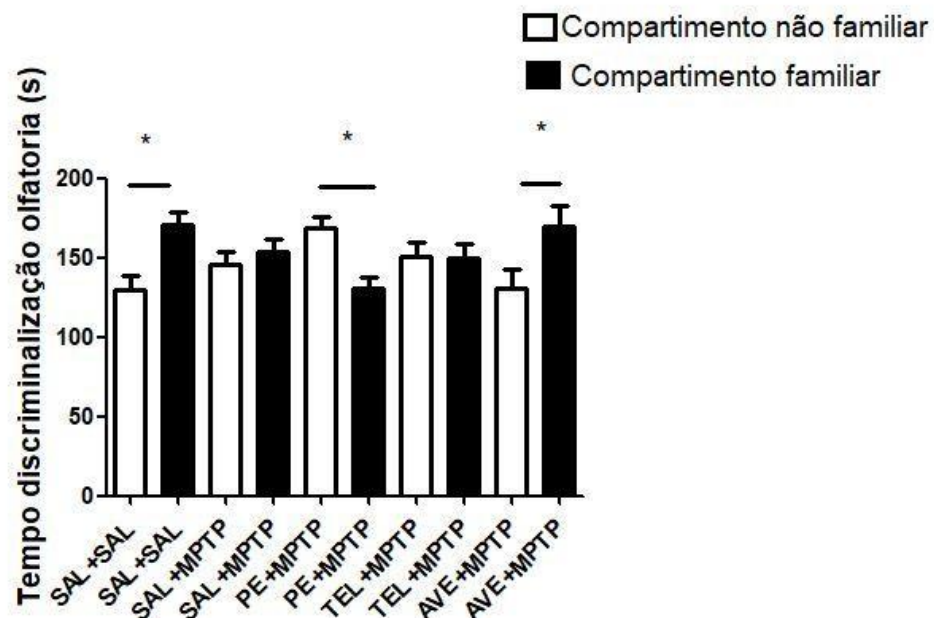


Figura 5: Teste de reconhecimento olfatório. Os animais apresentaram déficit no reconhecimento olfatório no 5° dpi de MPTP, que se agravou com o tratamento com o inibidor da

ECA, o Perindopril. Entretanto, os animais submetidos ao tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE0991, não apresentaram danos olfatórios no 5º dpi. Teste t student ($p < 0,05$).

* indica diferença em relação ao tempo de permanência nos compartimentos ($n = 8$ por grupo)

7.2 Infusão intranasal de MPTP não está associada com alterações locomotoras.

Não foram encontradas alterações locomotoras no teste do campo aberto no 6º e 11º dpi intranasal com MPTP. Além disso, as administrações dos moduladores do SRA também não ocasionaram déficits motores (Fig. 6A-B).

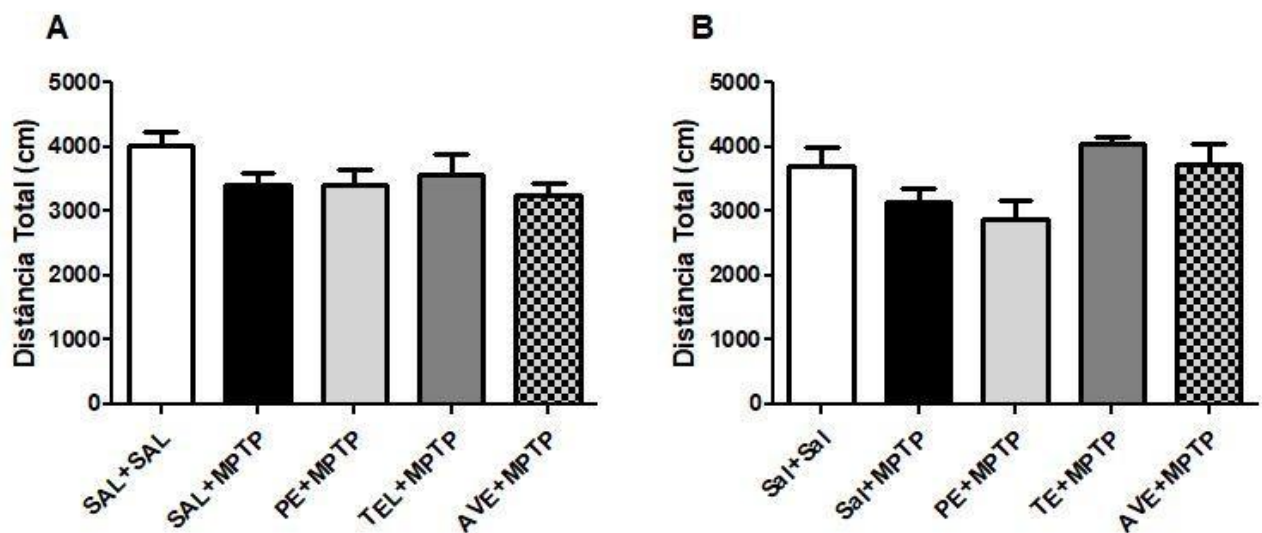
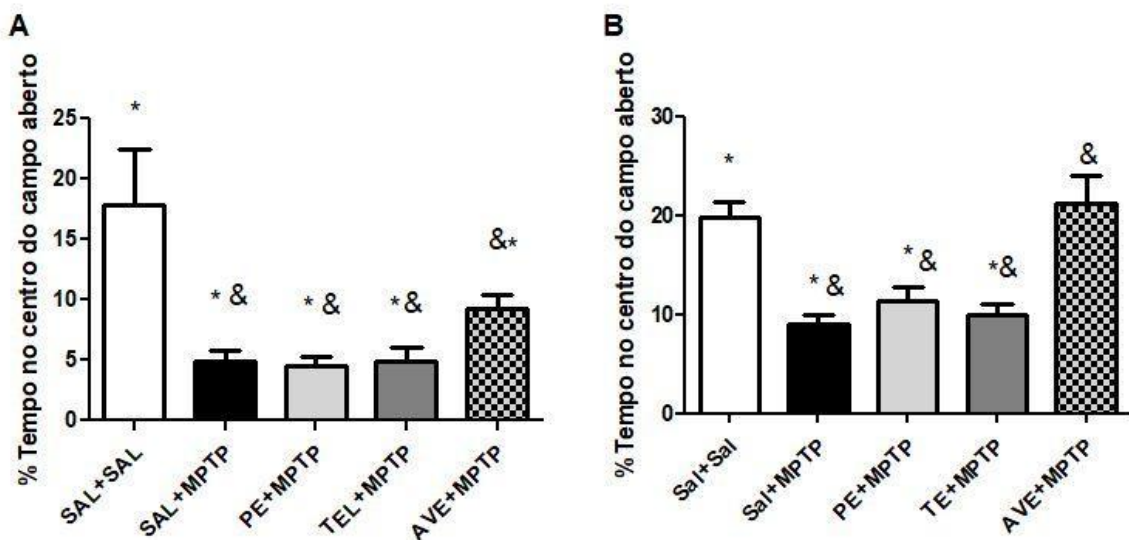


Figura 6: Avaliação da atividade locomotora. Distância total percorrida em cada um dos grupos avaliada pelo Teste de Campo Aberto. **(A)** animais submetidos ao teste no 6º dia após infusão de MPTP e tratados com os moduladores do SRA, teste one-way ANOVA ($n = 8$ por grupo); **(B)** animais submetidos ao teste no 11º dia após infusão de MPTP e tratados com os moduladores do SRA, teste one-way ANOVA. ($n = 5$ por grupo).

7.3 Tratamento com AVE0991 reverteu o comportamento do tipo ansioso nos animais no 11° dpi no Teste de Campo Aberto.

A análise da proporção de entradas no centro do aparato mostrou que os animais que receberam MPTP apresentaram uma menor proporção de entradas em relação aos animais salina no 6° dpi, indicando um comportamento do tipo ansioso. De forma interessante, o tratamento com o AVE0991 foi capaz de reverter parcialmente esse comportamento, embora não tenha retornado aos valores basais (Fig. 7A). No 11° dpi, os animais que receberam MPTP também apresentaram comportamento do tipo ansioso, o que foi completamente revertido pela



administração do AVE0991, reforçando o papel protetor do eixo contra regulatório (Fig. 7B).

Figura 7: Análise de ansiedade. Percentual de entradas no centro da caixa em Teste de Campo Aberto. **(A)** animais submetidos ao Teste no 6° dia após infusão (n =8 por grupo); **(B)** animais no 11° dia após infusão (n= 5 por grupo) * indica diferença em relação ao controle infundido com salina. & indica diferença entre os grupos infundidos com MPTP e tratados com AVE0991, teste one-way ANOVA (p<0,05).

7.4 Infusão com MPTP não alterou a memória de trabalho

Não se observou prejuízo na memória de trabalho, analisada pelo labirinto em Y, 11º dpi de MPTP ou após os tratamentos com os moduladores do SRA (Fig. 8)

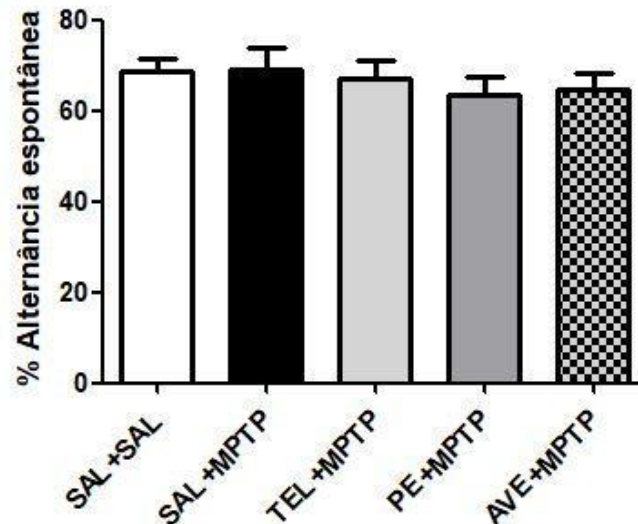


Figura 8: Memória de trabalho imediata. Porcentual de comportamento de alterações espontâneas sem diferença estatística entre os grupos. Teste one-way ANOVA ($p > 0,05$). (n = 8 por grupo)

7.5 A infusão com MPTP não induziu comportamento do tipo depressivo

O teste do nado forçado foi realizado no 9º dpi para análise do comportamento do tipo depressivo. Não foi encontrada diferença significativa para nenhum grupo avaliado nos parâmetros tempo de imobilidade ou frequência de repouso, indicando que, nesse período, nem o MPTP e nem os moduladores do SRA foram capazes de induzir tal alteração comportamental (Fig. 9).

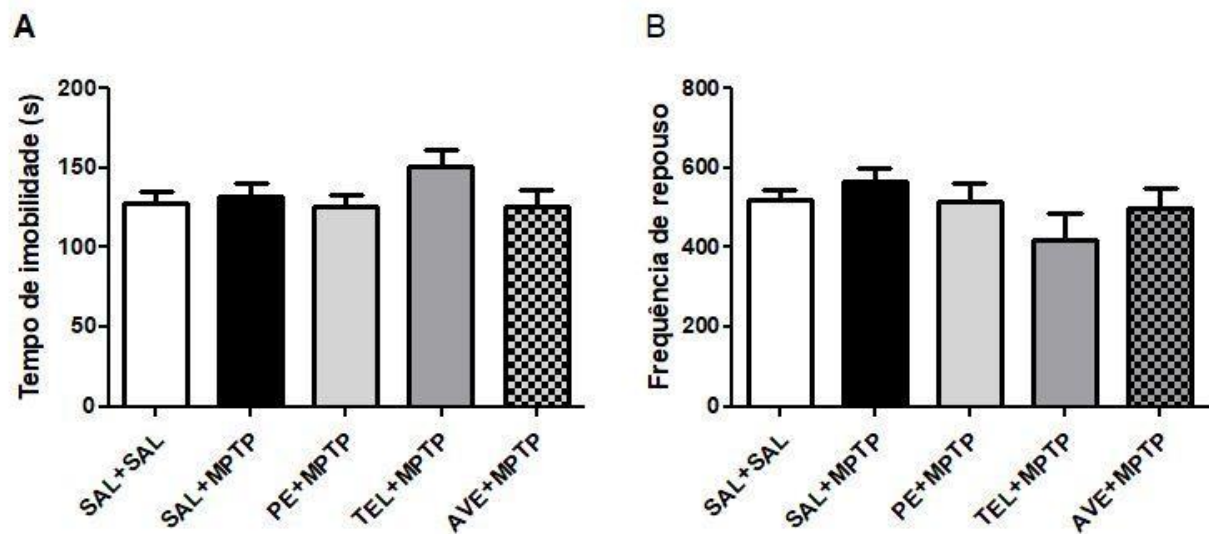


Figura 9: Análise do comportamento tipo depressivo. (A) Tempo em que o animal ficou em repouso durante o nado forçado. (B) Frequência em que o animal entrou em repouso. Teste one-way ANOVA ($P > 0,05$) ($n = 8$ por grupo).

7.6. Análise da concentração de componentes do Sistema Renina Angiotensina em regiões relevantes na Doença de Parkinson.

7.6.1 Estriado

7.6.1.1 Níveis dos componentes do SRA no estriado

A administração de MPTP não alterou os níveis estriatais dos componentes do SRA, assim como o tratamento com o perindopril, no 11º dpi. Em contrapartida, o tratamento com o Telmisartan induziu redução nos níveis de ECA2, quando comparado com o grupo SAL+SAL e AVE+MPTP, além de redução nos níveis de Ang(1-7), quando comparado com os outros grupos testados no 11º dpi. Contudo, o tratamento com o AVE0991 induziu um aumento significativo nos níveis de ECA em relação aos outros grupos testados (Fig. 10 A-D).

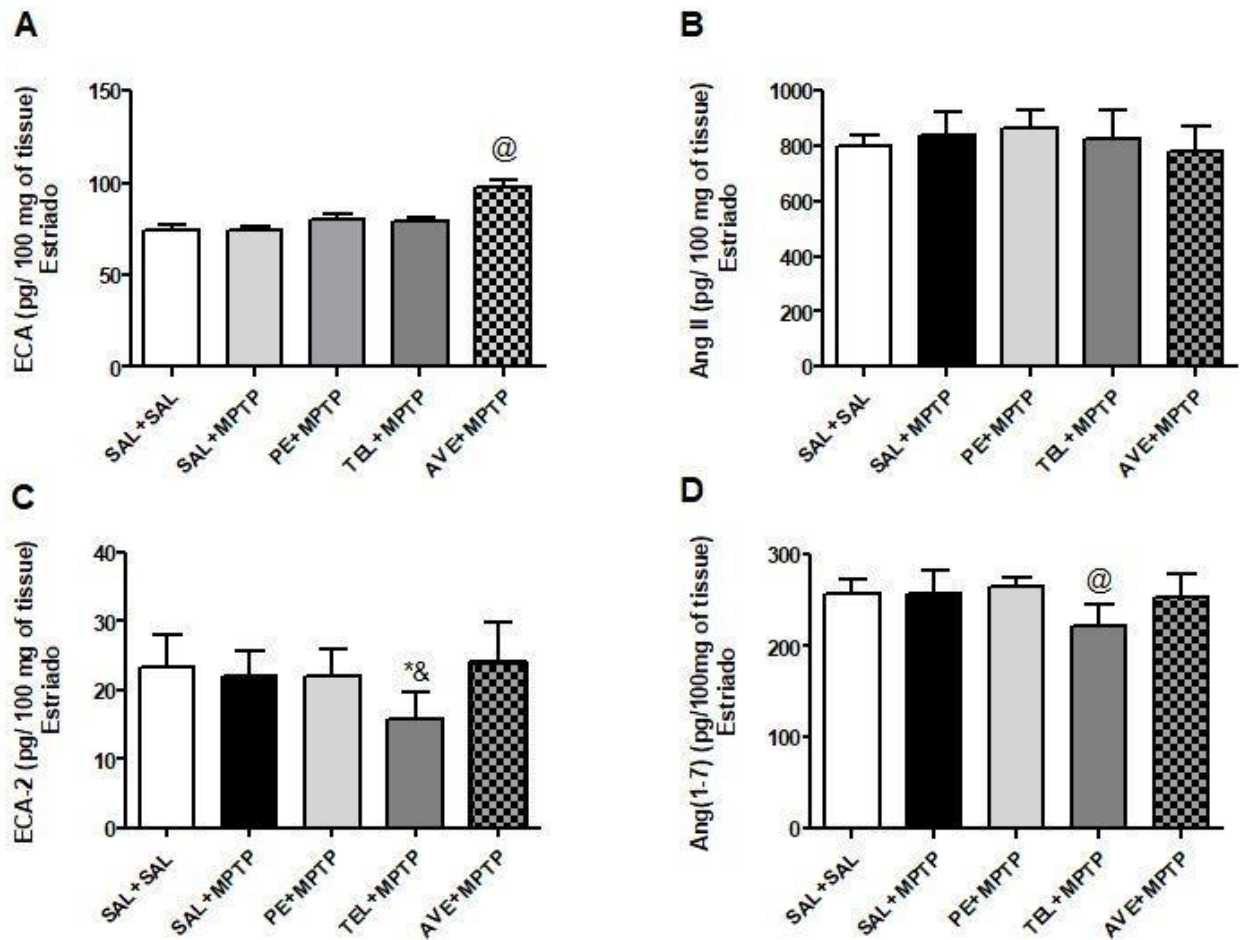


Figura 10: Níveis dos componentes do Sistema Renina Angiotensina no estriado de animais que receberam ou não MPTP. (A) Níveis da enzima conversora de angiotensina 1 (ECA); (B) Níveis de Angiotensina II (Ang II); (C) Níveis da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2); (D) Níveis teciduais da Angiotensina (1-7) (Ang(1-7)) (n=5 por grupo). No 11º dia após a infusão, o estriado foi coletado, processado e analisado por ELISA. * significa diferença entre o SAL+ SAL; & diferença entre AVE + MPTP; @ diferença entre todos os grupos. Teste One Way Anova (P<0,05)

7.6.1.2 Razão entre os componentes no estriado

A administração de MPTP aumentou a razão entre a AngII/Ang(1-7), quando comparado ao grupo SAL+SAL. O tratamento com Perindopril resultou na redução da razão entre AngII/Ang(1-7), voltando ao padrão do grupo SAL+SAL, quando comparado com o grupo SAL+MPTP. Por outro lado, o tratamento com o Telmisartan

aumentou a razão entre ECA1/ ECA2, quando comparado com o grupo SAL+MPT e manteve o aumento da razão de AngII/Ang(1-7). Por fim, o tratamento com o AVE0991 não alterou as razões entre os componentes no estriado no 11° dpi. (Fig. 11 A-B)

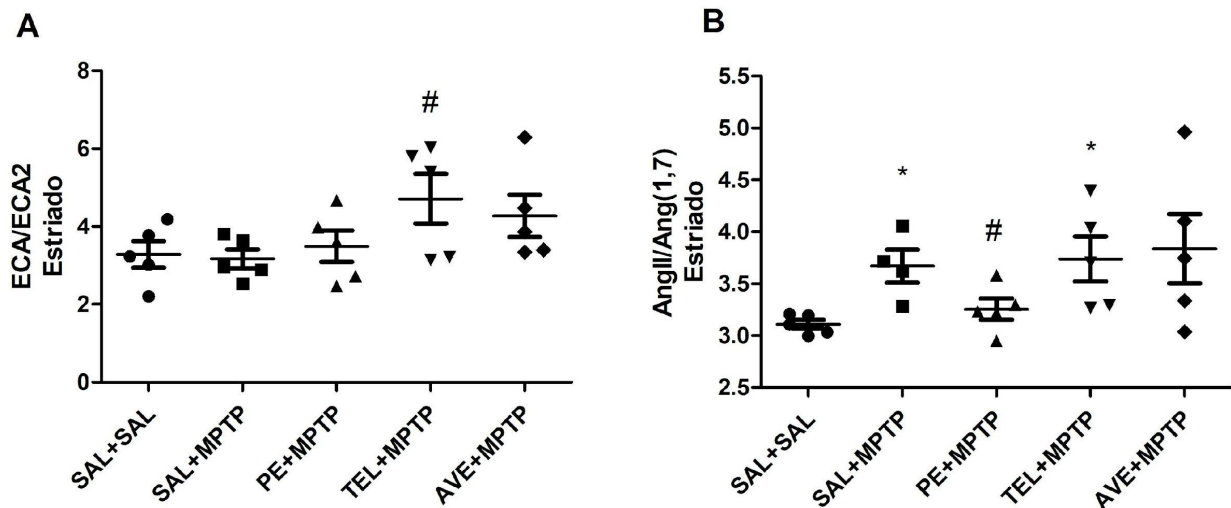


Figura 11: Razão entre os componentes do Sistema Renina Angiotensina no estriado de animais que receberam ou não MPTP A) Razão entre a ECA e ECA2; (B) Razão entre Ang II e Ang(1-7); (n=5 por grupo) * indica diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL; # indica a diferença significativa em relação ao grupo SAL+MPTP Teste One Way Anova (P<0,05)

7.6.2 Substância Negra

7.6.2.1 Níveis dos componentes do SRA na Substância Negra

A administração do MPTP não alterou os níveis dos componentes do SRA na substância negra no 11° dpi. O tratamento com o Perindopril aumentou os níveis de ECA2 e Ang II, em relação ao grupo SAL+SAL na substância negra no 11°dpi. Já o tratamento com o Telmisartan diminuiu a concentração da ECA e Ang II, quando comparado aos grupos SAL+SAL, SAL+MPTP, SAL+PE. Em contrapartida,

aumentou os níveis de ECA2 e Ang(1-7), em relação aos grupos SAL+SAL e SAL+MPTP. Por fim, o tratamento com o AVE0991 diminuiu os níveis de ECA, quando comparado aos grupos SAL+SAL, SAL+MPTP, PE+MPTP. Entretanto, aumentou os níveis de AngII e Ang(1-7) em relação ao grupo SAL+SAL na substância negra (Fig: 12 A-D)

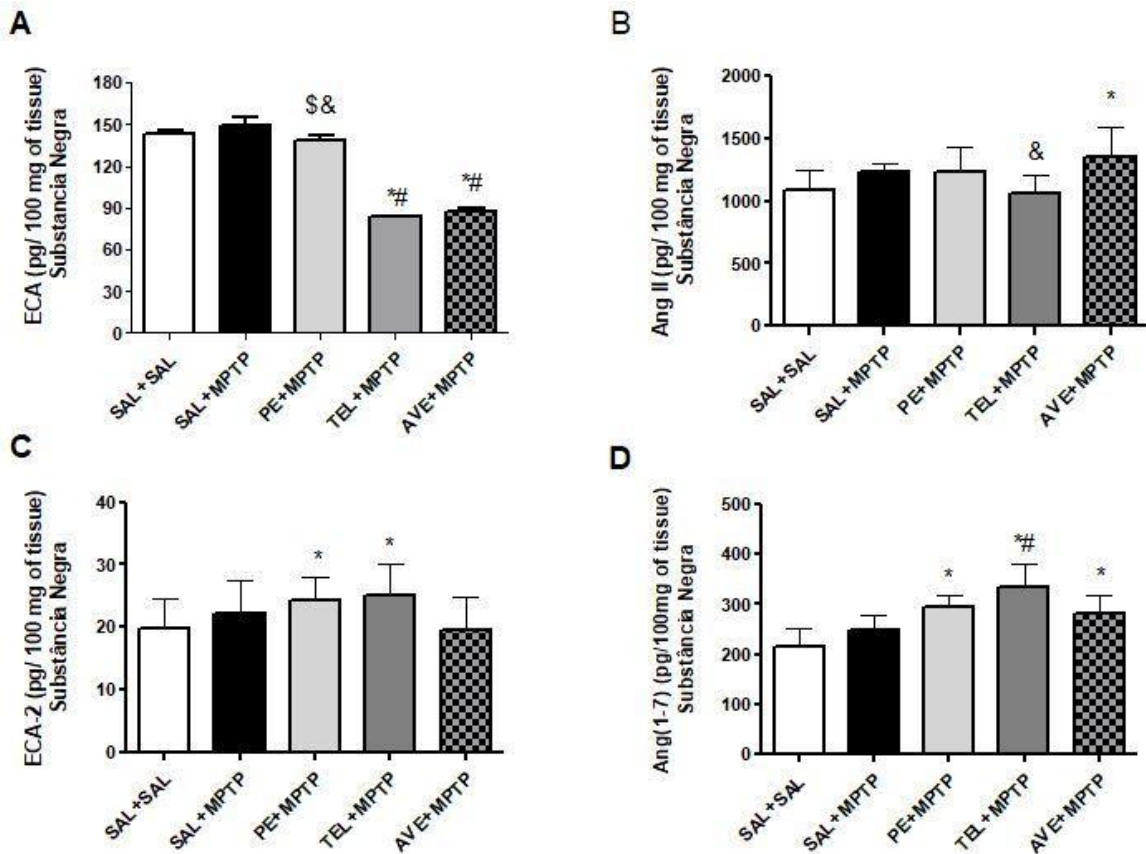


Figura 12: Níveis dos componentes do Sistema Renina Angiotensina na substância negra de animais que receberam ou não MPTP. (A) Níveis da enzima conversora de angiotensina (ECA); (B) Níveis de Angiotensina II (Ang II); (C) Níveis da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2); (D) Níveis teciduais da Angiotensina (1-7) (Ang(1-7)). (n = 5 por grupo). No 11º dia após infusão, a substância negra foi coletada, processada e analisada por ELISA.

*significa diferença entre o SAL+ SAL;# diferença entre SAL+MPTP; & diferença entre AVE + MPTP; \$ diferença entre o grupo TE+MPTP; . Teste One Way Anova (P<0,05)

7.6.2.2 Razão entre os componentes do SRA na substância negra

A administração do MPTP, assim como o tratamento com o Perindopril não alteraram os valores das razões de ECA/ECA2 e AngII/Ang(1-7) na substância negra no 11ºdpi. Contudo, o tratamento com o Telmisartan diminuiu a razão de ECA/ECA2 e aumentou a razão de AngII/Ang(1-7), quando comparado com os grupos SAL+SAL e SAL+MPTP, na substância negra no 11ºdpi. Já o tratamento com o AVE0991 apenas diminuiu a razão da ECA/ECA2 na substância negra no 11ºdpi.

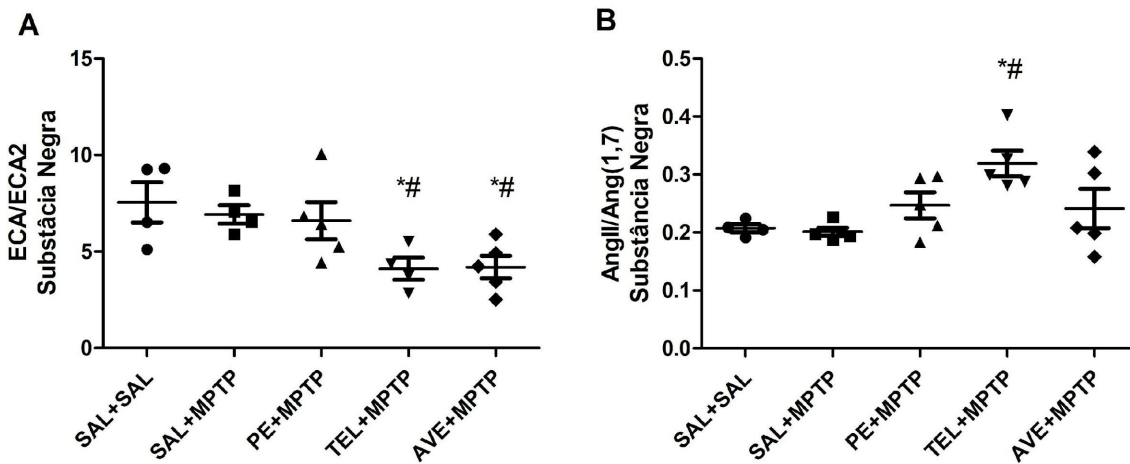


Figure 13: Razão entre os componentes do Sistema Renina Angiotensina na substância negra de animais que receberam ou não MPTP A) Razão entre a ECA e ECA2; (B) Razão entre Ang II e Ang(1-7) (n=5 por grupo) . * indica diferença significativa em relação ao grupo SAL+SAL; # indica a diferença significativa em relação ao grupo SAL+MPTP. Teste One Way Anova (P<0,05)

7.6.3 Hipocampo

7.6.3.1 Níveis dos componentes do SRA no hipocampo

A administração de MPTP, assim como o tratamento com o Perindopril reduziram os níveis de Ang II e Ang(1-7) no hipocampo no 11ºdpi, quando comparado com o grupo SAL+SAL. Já o tratamento com o Telmisartan reduziu os

níveis de Ang II, quando comparado com o grupo SAL+SAL, Ang(1-7), quando comparado com SAL+SAL e SAL+MPTP e ECA2, quando comparado com o grupo SAL+MPTP, AVE+MPTP, no 11º dpi no hipocampo. Por fim, o tratamento com o AVE0991 reduziu os níveis de Ang II, quando comparado com os grupos SAL+SAL e Ang(1-7), quando comparado com grupo SAL+SAL SAL+MPTP, no 11º dpi no hipocampo.(Figura: 14 A-D)

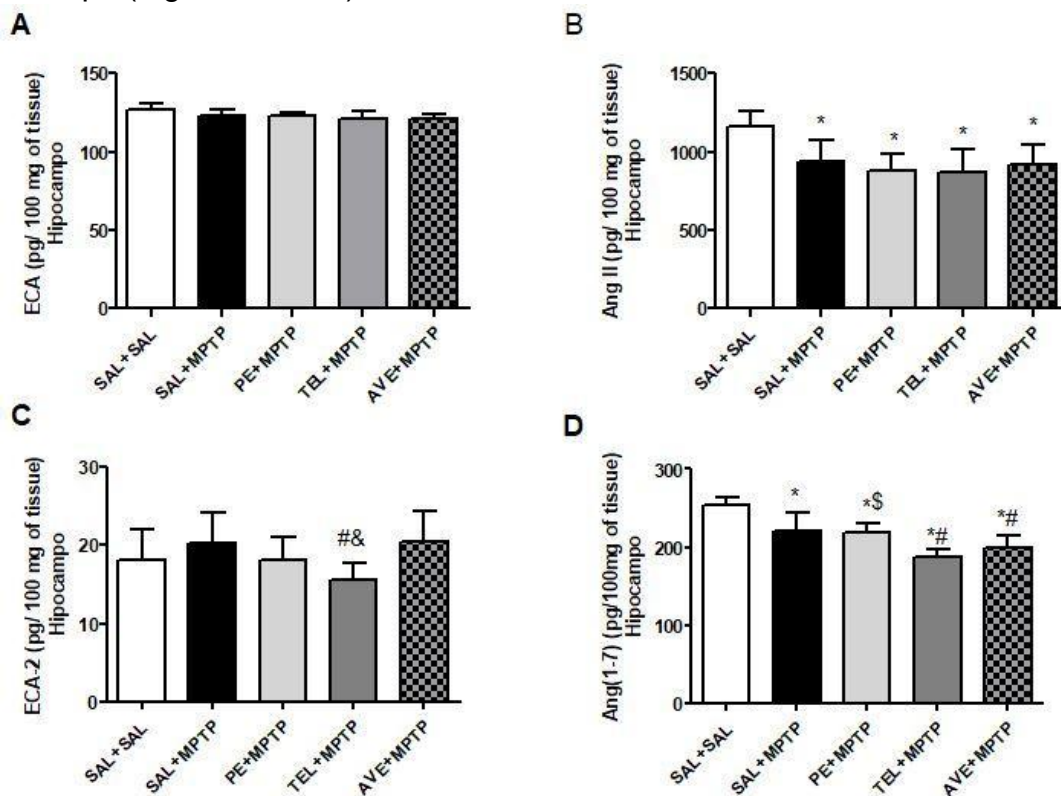


Figura 14: Níveis dos componentes do Sistema Renina Angiotensina no hipocampo de animais que receberam ou não MPTP (A) Níveis da enzima conversora de angiotensina (ECA); (B) Níveis de Angiotensina II (Ang II); (C) Níveis da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2); (D) Níveis teciduais da Angiotensina (1-7) (Ang(1-7)) (n = 5 por grupo). No 11º dia após infusão, o hipocampo foi coletado, processado e analisado por ELISA. * significa diferença entre o SAL+ SAL; # significa diferença entre o SAL+MPTP; & diferença entre AVE + MPTP. Teste One Way Anova (P<0,05)

7.6.2.2 Razão entre os componentes do SRA no hipocampo

A administração do MPTP, assim como o tratamento com os moduladores do SRA não foram capazes de alterar de forma significativa os valores entre as razões de ECA/ECA2 e AngII/Ang(1-7) no 11ºdpi no hipocampo. (Figura: 15 A-B)

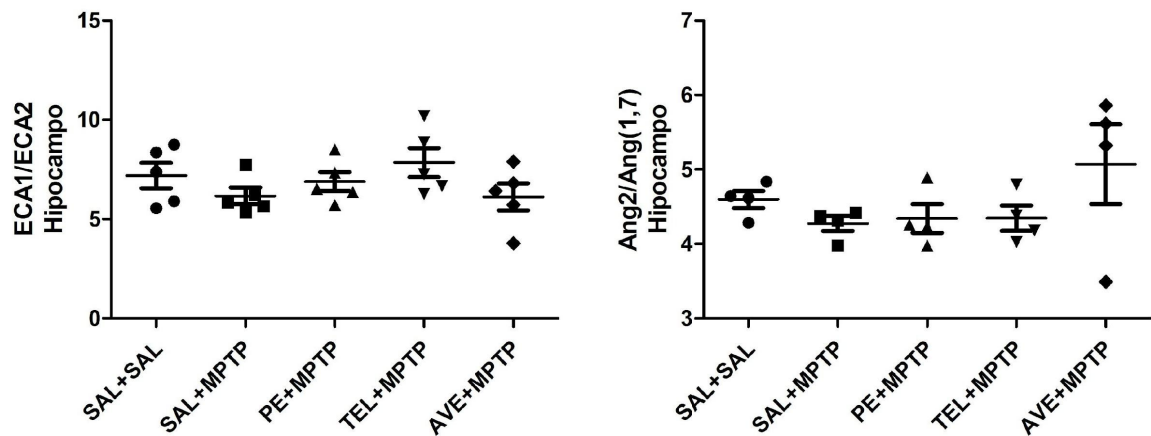


Figura 15: Razão entre os componentes do Sistema Renina Angiotensina no hipocampo de animais que receberam ou não MPTP A) Razão entre ECA e ECA2; (B) Razão entre Ang II e Ang(1-7) (n=5 por grupo) .Teste One Way Anova (P<0,05)

8.0 Discussão

Desde a descoberta da presença do sistema renina angiotensina (SRA) no encéfalo, muitos estudos têm - se concentrado na eficácia dos moduladores do SRA para tratamento de doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer e DP (Mertens et. al., 2010). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez, potenciais efeitos neuroprotetores da ativação do eixo contra- regulatório do SRA no desenvolvimento e progressão dos sintomas não motores da DP.

Os sintomas não motores da DP podem aparecer até 25 anos antes dos sinais motores ou cardinais da doença (Ferrer et al, 2011; Savica et al, 2010, Poewe 2008). Nossos resultados mostraram que, no 6º e 11º dpi de MPTP, os animais não apresentaram prejuízos motores. Do mesmo modo, o estudo realizado por Prediger e colaboradores (2010) mostrou que com apenas uma única infusão intranasal de MPTP (0,1mg/narina) em camundongos C57BL/6 não foi possível verificar alterações motoras, mas os sintomas característicos da fase não motora da doença, como alterações sensoriais, déficits de memória, estavam presentes no 20º dpi.

O sistema olfatório danificado é um sintoma comum na fase pré-motora da DP (Boesveldt et al., 2008). Alguns estudos já evidenciaram déficits olfatórios em modelos animais baseados em neurotoxinas seletivas para dopamina, tais como o MPTP (Prediger et al., 2010; Castro et al., 2012; Fortuna et al., 2017). No presente estudo, a infusão de MPTP causou um déficit significativo na memória olfatória no 5º dpi. Prediger e colaboradores (2010) também mostraram alterações na memória olfatória no 5º dpi com uma única dose de MPTP (1mg/narina). Kurtenbach e colaboradores (2013) não encontraram alterações olfatórias neste modelo experimental, analisaram os déficits olfatórios apenas no 20º dpi e utilizaram apenas a metade da dose de MPTP (0,5mg/narina). .

Nos últimos anos, estudos com inibição do eixo clássico do SRA por meio de moduladores do SRA têm evidenciado um papel protetor em algumas doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer, acidente vascular encefálico além dos sintomas motores da DP (Rocha et al., 2018). Nossos resultados mostraram que o tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE0991, impediu prejuízos na memória olfatória, que se mostrou semelhante ao controle no 5º dpi. Entretanto, diferente do que se esperava, o tratamento com a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), o Perindopril, e o inibidor do receptor de angiotensina do tipo 1 (AT1), o Telmisartam, não protegeram os camundongos C57BL/6 da perda de memória olfatória no 5º dpi de MPTP. Nas doses de 5mg/kg de perindopril e 10mg/Kg de Telmisartan.

Depressão e ansiedade são sintomas comuns em muitas doenças neurodegenerativas, tais como doença de Alzheimer, demência vascular, entre outras (Ferrer et. al., 2011; Savica et. al., 2010). Em nosso trabalho os animais que receberam MPTP apresentaram comportamento do tipo ansioso no 6º dpi e que se manteve no 11º dpi, apesar de não ter sido observado no 9º dpi. Do mesmo modo, Nagayama e colaboradores (2014) encontraram um comportamento do tipo ansioso no 5º dia após administração intraperitoneal de MPTP (30mg/kg) em camundongos C57BL/6. Destaca-se que Weintraub e colaboradores (2005) demonstraram uma correlação entre transportadores de dopamina da via estriatal e a presença de ansiedade e depressão em pacientes de DP.

O tratamento com o agonista do receptor Mas, AVE0991, reverteu o comportamento do tipo ansioso, parcialmente no 6ºdpi de MPTP e, completamente, no 11º dpi de MPTP. Entretanto, a inibição dos receptores AT1 e da ECA não foram

capazes de reverter o comportamento do tipo ansioso nos 6º e 11º dpi de MPTP. Estudos vêm investigando a relação entre a ativação excessiva dos receptores AT1 e o comportamento do tipo ansioso, além de verificar o efeito protetor da inibição do SRA na ansiedade e depressão de pacientes com doenças neurodegenerativas (Saavedra et.al., 2011). Bild e colaboradores (2013) verificaram que a ativação dos receptores Mas, através da administração intraventricular de Ang (1-7), foi capaz de reverter o comportamento do tipo ansioso em ratos Wistar. Esses autores mostraram que esses efeitos foram acompanhados de uma redução drástica no estresse oxidativo da região das amígdalas, região com papel importante na ansiedade. Corroborando esses resultados, estudos feitos com camundongos que hiperexpressam ECA2 demonstraram que a redução do comportamento do tipo ansioso é dada pela ativação dos receptores Mas, uma vez que o tratamento com seu inibidor A779, por injeção intraventricular, não resultou em melhora no comportamento do tipo ansioso (Kangussu et al., 2017).

O SRA encontra-se altamente expresso na substância negra e no estriado de roedores e primatas, incluindo humanos (Garrido-Gil et. al., 2013). O SRA está envolvido diretamente com os neurônios dopaminérgico através da via NADPH e da produção de ROS (Loot et.al.2009). Estudos em modelos animais têm demonstrado um papel dos receptores AT1 na degeneração dopaminérgica, pois sua ativação exacerbada aumenta a morte de neurônios dopaminérgicos (Labandeira-garcia et. al., 2013; Labandeira-garcía et.al.,2014; Grammatopoulos et al., 2007).

Contudo, diferente do que esperávamos, nossos resultados demonstraram que a infusão de MPTP não foi capaz de alterar drasticamente os níveis dos componentes do SRA no 11ª dpi de MPTP nas regiões relevantes da DP, tais como

estriado e substância negra. Entretanto, esse tratamento diminuiu os níveis de Ang II e Ang(1-7) no hipocampo no 11º dpi. Poucos trabalhos têm analisado as alterações nas concentrações dos componentes do SRA. Kehoe e colaboradores (2016) observaram que em cérebros de pacientes da doença de Alzheimer, há uma redução nos níveis de ECA2 e um aumento de ECA. Além do mais, apesar de não encontrarem diferença nos níveis de Ang (1-7), os pacientes apresentaram um aumento na razão entre a Ang II e Ang(1-7) , o que pode indicar uma redução na produção de Ang (1-7) no córtex pré-frontal. No entanto, na DP ocorreu uma redução dos níveis de Ang II, Ang(1-7) no soro de pacientes (Rocha et. al., 2016). Entretanto, nenhum estudo analisou em modelos não motores da DP.

Estudos como o de Sonsalla e colaboradores (2013) demonstraram que o uso de moduladores do SRA pode resultar em um papel neuroprotetor aos sintomas da DP. Porém, nossos resultados sugerem que o tratamento com o Perindopril alterou apenas os níveis dos componentes do SRA na substância negra, diminuiu os níveis de ECA aumentou os níveis de ECA2 e a razão de AngII/Ang(1-7) no 11º dpi. Já o tratamento com o Telmisartan diminuiu a concentração dos componentes do eixo contra regulatório nas regiões do estriado e hipocampo. Por outro lado, na região da substância negra aumentou ECA2 e Ang(1-7), indicando um possível mecanismo compensatório, uma vez que a região da substância negra é a principal região afetada. Por fim, o tratamento com o AVE0991 alterou sutilmente os níveis dos componentes do SRA. Tendo seu maior efeito na substância negra, na qual aumentou a Ang(1-7) e Ang II e reduziu os níveis ECA e a razão ECA/ECA2. Contudo, somente no tratamento com o AVE0991 foi possível verificar uma proteção nos sintomas não motores, tais como melhora na memória olfatória e ansiedade dos animais no 11ºdpi.

Grammatopoulos e colaboradores (2007), demonstraram que os efeitos neuroprotetores dos inibidores da ECA e receptores do AT1 foram independentes da ativação dos receptores AT1e AT2 *in vitro*. Além do mais, Jiang e colaboradores (2018), demonstraram que o tratamento com o AVE0991 pode prevenir doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade, uma vez que a ativação do receptor Mas ativa um perfil resolutivo da micróglia. Estes estudos reforçam a nossa hipótese de que o eixo contra regulatório tem um papel importante na proteção dos sintomas não motores da DP.

9.0 Conclusão

A neuroproteção dos moduladores do SRA parece não estar diretamente relacionada com os níveis dos componentes do SRA, além de que a potencialização do eixo contra-regulatório do Sistema Renina Angiotensina desempenha um papel crucial na neuroproteção dos sinais pré-clínicos da DP, tais como a perda da memória olfatória e ansiedade.

10. Perspectivas Futuras

Nossos resultados sugerem um papel promissor do eixo contra regulatório do SRA na neuroproteção dos sintomas não motores da DP, sendo assim, pretendemos continuar a investigar a modulação deste sistema por meio das técnicas abaixo:

- ❖ Análise da morte dos neurônios dopaminérgicos – Imunohistoquímica –

Tirosina Hidroxilase

- ❖ Análise histológicas dos bulbos olfatório

- ❖ Análise memória social – Teste Reconhecimento Social

- ❖ Análise da memória de medo – Teste de Esquiva Inibitória

- ❖ Análise do comportamento do tipo ansioso – Teste Labirinto em Cruz

Elevado

- ❖ Análise dos níveis dos fatores neurotróficos tais como BDNF, NGF,

GDNF - ELISA

- ❖ Análise de citocinas inflamatórias –CBA

- ❖ Marcação de micróglia – Imunohistoquímica – Iba1

- ❖ Marcação de Neurônio – Imunohistoquímica - NeuN

- ❖ Análise da expressão de receptores do SRA (AT1, AT2, Mas) – RTPCR

- ❖ Análise do Estresse Oxidativo – Imunofluorescência

11.0 Referências

- Abdullah, R.; Basak, I.; Patil, K.S.; Alves, G.; Larsen, J.P.; Møller, S.G. (2015). Parkinson's disease and age: The obvious but largely unexplored link. *Exp. Gerontol*, 68, 33–38.
- Arduino, D. M., Esteves, A. R., Oliveira, C. R., And Cardoso, S. M. (2010). Mitochondrial Metabolism Modulation: A New Therapeutic Approach For Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 9, 105-119.
- Bendor, J.T. Logan TP, Edwards RH.. (2013) The function of α -synuclein. *Neuron* 79, 1044–1066
- Bezard E, Przedborski S. (2011). A tale on animal models of Parkinson's disease. *Mov Disord* 26: 993–1002
- Bild, W., & Ciobica, A. (2013). effects in elevated plus maze and decreased oxidative stress in the amygdala. *Journal of Affective Disorders*, 145(2), 165–171.
- Birkmayer W, Hornykiewicz O (1961): The L-3,4-dioxyphenylalanine (DOPA)-effect in Parkinson-akinesia. *Wien Klin Wochenschr.*; 73: 787–8.
- Block, M.L., Hong, J.S., (2005). Microglia And Inflammation-Mediated Neurodegeneration: Multiple Triggers With A Common Mechanism. *Prog. Neurobiol.*, 76, 77-98.
- Boesveldt S, Verbaan D, Knol DL, Visser M, van Rooden SM, van Hilten JJ, (2008). A comparative study of odor identification and odor discrimination deficits in Parkinson's disease. *Mov Disord*, 23: 1984–1990.
- Franceschi, F. Campisi J. (2014). Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 69 S4–S9
- Franceschi C. , Bonafè M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. (2000). Inflamm-aging: an evolutionary perspective on immunosenescence, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 908 244–254,
- Castro, A. A., Ghisoni, K., Latini, A., Quevedo, J., Tasca, C. I., & Prediger, R. D. S. (2012). Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory (MPTP) rat model of Parkinson ' s disease. *Behavioural Brain Research*, 229(1), 208–215.

Monti D., Ostan R., Borelli V., Castellani G., Franceschi C. (2016), Inflammaging and human longevity in the omics era, *Mech. Ageing Dev.* S0047-6374 (16) 30261–30265.

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

Da Cunha C., Angellucci M.E.M., Canteras N.S., Wonnacott S., Takahashi R.N. (2002). The lesion of the rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons as a model for Parkinson's disease memory disabilities. *Cell Mol Neurobiol*, 22, 227- 237.

Da Cunha C., Wietzikoski S., Wietzikoski E. C., Miyoshi E., Ferro M.M., Anselmo-Franci J.A., Canteras N. (2003). Evidence for the substantia nigra pars compacta as an essential component of memory system independent of hippocampal memory system. *Neurobiol Learn Mem* 79, 236-242.

Da Cunha C.R., Takahashi R.N., Canteras N.S. (2001). Memory disruption in rats with nigral lesions induced by MPTP: a model for early Parkinson's disease amnesia. *Behav Brain Res*, 124, 9-18.

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

Dawson TM, Ko HS, Dawson VL. (2010). Genetic animal models of Parkinson's disease. *Neuron* 66: 646–661.

Dominguez-Mejide A, Villar-Cheda B, Garrido-Gil P, Sierra-Paredes G, Guerra MJ, Labandeira-Garcia JL (2014). Effect of chronic treatment with angiotensin type 1 receptor antagonists on striatal dopamine levels in normal rats and in a rat model of Parkinson's disease treated with L-DOPA. *Neuropharmacology*; 76:156–168.

Ottaviani E., Franceschi C. (1998), A new theory on the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress response: the invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witness, *Domest. Anim. Endocrinol.* 15 291–296.

Elbaz , L. Carcaillon , S. Kab F. Moisan (2016) Epidemiology of Parkinson's disease *NEUROL-1580*; No. of Pages 13

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.

Fortuna, J. T. S., Gralle, M., Beckman, D., Neves, F. S., Diniz, L. P., Frost, P. S., ... Clarke, J. R. (2017). Brain infusion of α -synuclein oligomers induces motor and non-motor Parkinson ' s disease-like symptoms in mice. *Behavioural Brain Research*, 333(March), 150–160.

Grammatopoulos, T. N., Jones, S. M., Ahmadi, F. A., Hoover, B. R., Snell, L. D., Skoch, J., ... Zawada, W. M. (2007). Angiotensin type 1 receptor antagonist losartan , reduces MPTP-induced degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra, *17*, 1–

Guan, Z., ;Fang, J. (2006) .Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav. Immun.* 20, 64–71

Hanley, M.R.; Cheung, W.T.; Hawkins, P.; Poyner, D.; Benton, H.P.; Blair, L.; Jackson, Hindle, J. (2010). Ageing, Neurodegeneration And Parkinson's Disease. *Age Ageing* 39, 156-161.

Hornykiewicz O. (2008). Basic research on dopamine in Parkinson's disease and the discovery of the nigrostriatal dopamine pathway: the view of an eyewitness. *Neurodegener Dis.* 008;5:114–117.

Hunn, B.H. Cragg SJ, Bolam JP, Spillantini MG, Wade-Martins R. (2015) Impaired intracellular trafficking defines early Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 38, 178–188

Ismail H, Mitchell R, McFarlane SI, Makaryus AN. (2010). Pleiotropic effects of inhibitors of the RAAS in the diabetic population: above and beyond blood pressure lowering. *Curr Diab Rep*;10:32–36.

Jackson-Lewis Vernice, Przedborski Serge;(2007) Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease nature protocols | VOL.2 NO.1 | 2007 | 141

Jankovic, J., (2008). Parkinson's Disease: Clinical Features And Diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-376.

Jellinger, K.A. (2012) Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: Evaluation and changes of concepts. *Mov. Disord.*, 27, 8–30.

Jiang, T., Xue, L. J., Yang, Y., Wang, Q. G., Xue, X., Ou, Z., ... Zhang, Y. D. (2018). AVE0991, a nonpeptide analogue of Ang-(1-7), attenuates aging- related neuroinflammation, *Aging* 10(4),

645–657.

Jiang, T.; Gao, L.; Shi, J.; Lu, J.; Wang, Y.; Zhang, Y., (2013) Angiotensin-(1-7) modulates renin-angiotensin system associated with reducing oxidative stress and attenuating neuronal apoptosis in the brain of hypertensive rats. *Pharmacol Res*, , 67, (1), 84-93.

Kalia, L.V. Kalia SK, McLean PJ, Lozano AM, Lang A (2013). α -Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann. Neurol.* 7. 3, 155–169

Kangussu, L. M., Almeida-santos, A. F., Moreira, F. A., Fontes, M. A. P., Santos, R. A. S., Aguiar, D. C., & Campagnole-santos, M. J. (2017). Reduced anxiety-like behavior in transgenic rats with chronically overproduction of angiotensin- (1 – 7): Role of the Mas receptor. *Behavioural Brain Research*, 331(March), 193–198.

Kehoe, P. G., Wong, S., Mulhim, N. A. L., Palmer, L. E., & Miners, J. S. (2016). Angiotensin-converting enzyme 2 is reduced in Alzheimer ' s disease in association with increasing amyloid- β and tau pathology. *Alzheimer's Research & Therapy*, 1, 1–10.

Kumar, A., Rassoli, A., and Raizada, M. K. (1988). Angiotensinogen gene expression in neuronal and glial cells in primary cultures of rat brain. *J. Neurosci. Res.* 19, 287–290. doi: 10.1002/jnr.490190302

Kurinami H, Shimamura M, Sato N, Nakagami H, Morishita R.(2013). Do angiotensin receptor blockers protect against Alzheimer's disease? *Drugs Aging*; 30:367–372.

Kurosaki R, Muramatsu Y, Kato H. (2005). Effect of angiotensin- converting enzyme inhibitor perindopril on interneurons in MPTP-treated mice. *Eur Neuropsychopharmacol*;15(1):57-

Kurtenbach, S., Wewering, S., Hatt, H., Neuhaus, E. M., & Lu, H. (2013). Olfaction in Three Genetic and Two MPTP-Induced Parkinson ' s Disease Mouse Models, 8(10).

Labandeira-garcía, J. L., Garrido-gil, P., Rodriguez-pallares, J., & Valenzuela, R. (2014). Brain renin-angiotensin system and dopaminergic cell vulnerability, 8(July), 1–8.

Labandeira-garcia, J. L., Rodriguez-pallares, J., & Dominguez-meijide, A. (2013). Dopamine-Angiotensin Interactions in the Basal Ganglia and Their Relevance for Parkinson's Disease The Renin-Angiotensin System Brain RAS and Disease A Dopamine-Angiotensin Interaction in the Nigrostriatal System The Local RAS in the Nigrostriatal Dopaminergic System : Paracrine RAS and

Intraneuronal RAS Altered Brain RAS Function and Dopaminergic Degeneration, 28(10), 1337–1342.

Lanz TV, Ding Z, Ho PP, Luo J, Agrawal AN, Srinagesh H, Axtell R, Zhang H, Platten M, Wyss-Coray T, Steinman L. (2010). Angiotensin II sustains brain inflammation in mice via TGF-beta. *J Clin Invest*;120:2782–2794.

Lapchak, P.A., Araujo, D.M., Hefti, F. (1993). Systemic interleukin -1beta decreases brain-derived neurotrophic factor messenger RNA expression in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 53, 297–301. doi:10.1016/0306-4522(93)90196-m

Lazaroni, T.L.; Raslan, A.C.; Fontes, W.R.; de Oliveira, M.L.; Bader, M.; Alenina, N.; Moraes, M.F.; Dos Santos, R.A.; Pereira, G.S. (2012). Angiotensin-(1-7)/Mas axis integrity is required for the expression of object recognition memory. *Neurobiol Learn Mem*, 97, (1), 113-123.

Lev-Ran, A., and Porta, M. (2005). Salt and hypertension: a phylogenetic perspective. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 21, 118–131. doi:10.1002/dmrr.539

Loot AE, Schreiber JG, Fisslthaler B, Fleming I (2009). Angiotensin II impairs endothelial function via tyrosine phosphorylation of the endothelial nitric oxide synthase. *J Exp Med*; 206: 2889-96

Lopez-Real A, Rey P, Soto-Otero R (2005). Angiotensin converting enzyme inhibition reduces oxidative stress and protects dopaminergic neurons in a 6-hydroxydopamine rat model of parkinsonism. *J Neurosci Res*;81:865-73.

McClellan Karen J.; Markham Anthony (1998) Telmisartan *Drugs* 1998 Dec; 56 (6): 1039-1044
0012-6667/98/0012-1039/\$06.00/0

Mertens, B., Vanderheyden, P., Michotte, Y., & Sarre, S. (2010). The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease, 49–56.

Mertens, B., Vanderheyden, P., Michotte, Y., Sarre, S. (2010). The role of the central renin-angiotensin system in Parkinson's disease. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 11, 49e56.

Milsted, A., Barna, B. P., Ransohoff, R. M., Brosnihan, K. B., and Ferrario, C. M. (1990). Astrocyte cultures derived from human brain tissue express angiotensinogen mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 87, 5720–5723. doi: 10.1073/pnas.87.15.5720

Munoz A, Rey P, Guerra MJ (2006). Reduction of dopaminergic degeneration and oxidative stress by inhibition of angiotensin converting enzyme in a MPTP model of parkinsonism. *Neuropharmacology*;51:112-20.

Nagayama, S., Homma, R., & Imamura, F. (2014). Neuronal organization of olfactory bulb circuits, *8*(September), 1–19.

Nelson L, Gard P, Tabet N. Hypertension and inflammation in Alzheimer's disease: close partners in disease development and progression *J Alzheimers Dis* 2014; 41:331–343.

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

Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R., (2006). Physiology of local renin-angiotensin Systems. *Physiol Rev*, 86, (3), 747- 803.

Pereira D, Garrett C.(2010) Factores de risco da doença de Parkinson um estudo epidemiológico. *Acta Med Port*;23:15-24.

Perry J. C., Da Cunha C., Anselmo-Franci J., Andreatini R. (2004). Behavioral and neurochemical effects on phosphatidylserine in MPTP lesion of the substantia nigra in rats. *Eur J Pharmacol*, 484, 225-233.

Ponsen M.M., Stoffers D, Booij J, van Eck-Smit BL, Wolters E, Berendse HW (2004). Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 56: 173–181.

Prediger, R. D., Aguiar, A. S., 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. *Neurotox Res.*, 17 (2), 114-129.

Przedborski S., Lewis V., Naini A.B., Jakowec M., Petzinger G., Miller R., Akram M. (2001). The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- 118 tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. *J Neurochem*, 76, 1265-1274.

Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., Almer, G (2000). The Parkinsonian Toxin MPTP: Action And Mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 16(2), 135-142.

Reardon KA, Mendelsohn FA, Chai SY, (2000). The angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor, perindopril, modifies the clinical features of Parkinson's disease. *Aust N Z J MeD*,30, 48-53.

Rebelatto JR, Calvo JI, Orejuela JR, Portillo JC. (2006) Influência de um programa de atividade física de longa duração sobre a força muscular e a flexibilidade corporal de mulheres idosas. *Rev Bras Fisioter*;10:127-32.

Rocha, N. P., Cristina, A., Ruiz, T., Prestes, R., Feracin, V., Machado, C. A., ... Miranda, A. S. De. (2018). RAS in the Central Nervous System : Potential Role in Neuropsychiatric Disorders, *1*, 1–20.

Rocha, N.P., Scalzo, P.L., Barbosa, I.G., De Campos-Carli, S.M., Tavares, L.D., De Souza, M.S. et al. (2016) Peripheral levels of angiotensins are associated with depressive symptoms in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* **368**, 235–239,

Rodrigues Prestes, T.R., Rocha, N.P., Miranda, A.S., Teixeira, A.L., Simoes-E-Silva,A.C.,(2017). The anti-Inflammatory potential of ACE2/angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis: evidence from basic and clinical research. *Curr. Drug Targets* 18 (11), 1301–1313

Saavedra JM, Sanchez-Lemus E, Benicky J. (2011). Blockade of brain angiotensin II AT1 receptors ameliorates stress, anxiety, brain inflammation and ischemia: Therapeutic implications. *Psychoneuroendocrinology*; 36:1–18.

Saavedra J.M. (2012). Angiotensin II AT(1) receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders. *Clin Sci (Lond)*; 123:567–590.

Saavedra J.M. (1992). Brain and pituitary angiotensin. *Endocr Rev*; 13:329–380.

Saavedra J. M (2012). Angiotensin II AT1 receptor blockers as treatments for inflammatory brain disorders, *Clin Sci (Lond)*. Author manuscript; available in PMC 2013 May 01.

Santos R.A.S.; Frézard F., Ferreira A.J. (2005) Angiotensin-(1-7): Blood, Heart, and Blood Vessels *Curr. Med. Chem. – Cardiovascular & Hematological Agents*, 2005, 3, 383-391

Santos, R.A.; Simoes e Silva, A.C.; Maric, C.; Silva, D.M.; Machado, R.P.; de Buhr, I.; Heringer-Walther, S.; Pinheiro, S.V.; Lopes, M.T.; Bader, M.; Mendes, E.P.; Lemos, V.S.; Campagnole-Santos, M.J.; Schultheiss, H.P.; Speth, R.; Walther, T., (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA*, , 100, (14), 8258-8263.

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

Sonsalla, P. K., Coleman, C., Wong, L., Harris, S. L., Richardson, J. R., Gadad, B. S., ... German, D. C. (2013). The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril protects nigrostriatal dopamine neurons in animal models of parkinsonism ☆. *Experimental Neurology*, 250, 376–383.

Souza CFM, Almeida HCP, Sousa JB, Costa PH, Silveira YSS, Bezerra JCL.(2011) A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. Rev Neurocienc 19(4):718-723

Stornetta, R. L., Hawelu-Johnson, C. L., Guyenet, P. G., and Lynch, K. R. (1988). Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242, 1444–1446.

Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O (2003). Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* ;35:881-900.18.

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. (2000). NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*;86:494-501.

Thomas, W. G., Greenland, K. J., Shinkel, T. A., and Sernia, C. (1992). Angiotensinogen is secreted by pure rat neuronal cell cultures. *Brain Res.* 588, 191–200. doi: 10.1016/0006-8993(92)91575-y

TSAI, H. H.; LEES, HOWDENC. W. REID J. L.(1989) The pharmacokinetics and harmacodynamics of perindopril in patients with hepatic cirrhosis Br. J. clin. Pharmac. (1989), 28, 53-59

Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; et al. (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 277:14838–43.

Poewe W., (2008) Non-motor symptoms in Parkinson_s disease; *European Journal of Neurology* 2008, 15 (Suppl. 1): 14–20

Birchmeier W., Ganten C, Bader D. (1998).Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem*, , 273, (19), 11867-11873.

Weintraub, D., Newberg, A. B., Cary, M. S., Siderowf, A. D., Moberg, P. J., Kleiner-fisman, G., ...

Katz, I. R. (2005). Striatal Dopamine Transporter Imaging Correlates with Anxiety and Depression Symptoms in Parkinson ' s Disease, 227–233.

Wichmann, T. & De Long, M. R. (2003). Functional Neuroanatomy Of The Basal Ganglia In Parkinson´S Disease. *Adv. Neurol.* 91, 9-18.

Yamazato, M.; Ferreira, A.J.; Yamazato, Y.; Diez-Freire, C.; Yuan, L.; Gillies, R.; Raizada, M.K. (2011). Gene transfer of angiotensin-converting enzyme 2 in the nucleus tractus solitaries improves baroreceptor heart rate reflex in spontaneously hypertensive rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 12, (4), 456-461.

Zhou J, Pavel J, Macova M, Yu ZX, Imboden H, Ge L, Nishioku T, Dou J, Delgiacco E, Saavedra JM (2006). AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats. *Stroke*; 37:1271–1276.

12.0 Apêndice

Apêndice A

Trabalhos realizados durante o mestrado

Artigos aceitos para a publicação

RACHID, M. A.; CARMAGOS, E. S.R.; MARZANO, L.; **OLIVEIRA, B. S.**; FERREIRA, R. N.; MARTINELLI, P. M.; TEIXEIRA, A. L.; SILVA, A. C. S. E.; MIRANDA, A. S. Effect of blockade of nitric oxide in heart tissue levels of Renin Angiotensin System components in acute experimental Chagas disease. LIFE SCIENCES. Fator de Impacto(2016 JCR): 2,9360, p.336 - 342, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. LIMA, L. C. D.; **OLIVEIRA, B. S.**; AGUIAR, D. C.; TOSCANO, E. C.; PORTELA., A. C. D. C.; OLIVEIRA., N. K.; MIRANDA, A. S.; RACHID, M. A. Alterações comportamentais e patológicas na encefalopatia hepática experimental. In: IV Encontro de Patologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte. IV Encontro de Patologia da UFMG. 2018.

2. MACHADO, C. A.; **OLIVEIRA, B. S.**; ALEXANDRE, C. H.; ABREU, L. K. S.; AZEVEDO, G. N.; CORDEIRO, T.; FERACIN, V.; FERREIRA, R. N.; CARMAGOS, E. S.R.; RACHID, M. A.; SILVA, A. C. S. E.; TEIXEIRA, A. L.. BEHAVIORAL CHANGES ARE ASSOCIATED WITH NEUROINFLAMMATORY PROCESSES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF TRAUMATIC BRAIN INJURY: PRELIMINARY RESULTS. In: 4th International Symposium on Inflammatory Diseases, 2018, Belo Horizonte.

3. SILVA, D. G.; CARVALHO, I. L. Q.; BRITO, E. T.; **OLIVEIRA, B. S.**; BRITO, L. F.; SOUSA, L. P.; FONSECA, F. G.; TEIXEIRA, M. M.; TEIXEIRA, A. L.; MIRANDA, A. S.; BARBOSA, E. F.; RACHID, M. A. CONTRIBUTION OF BDNF TO BRAIN PATHOLOGY AND CLINICAL CHANGES IN EXPERIMENTAL MENINGO-ENCEPHALITIS CAUSED BY BOVINE ALPHAHERPESVIRUS 5 IN MICE. In: Fourth International Symposium on Inflammatory Diseases - INFLAMMA IV, 2018, Belo Horizonte.

4. CAMARGOS, Q. M.; C, S. B.; SILVA, D. G.; **OLIVEIRA, B. S.**; MARIANO., T. A. S.; P.M.Q, B.; de Oliveira A.C.P; Vieira E. L. M; TAFURI, W. L.; TEIXEIRA, A. L.; MIRANDA, A. S.; RACHID, M. A. EFEITO DA EFEITO DA EFEITO DA EFEITO DA MINOCICLINA MINOCICLINA MINOCICLINA MINOCICLINA MINOCICLINA NO MODELO NO MODELO NO MODELO MURINO DE ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL “ In: IV Encontro de Patologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte.

5. OLIVEIRA., N. K.; LIMA, L. C. D.; SILVA, D. G.; **OLIVEIRA, B. S.**; VIEIRA, L. Q.; SILVA, A. C. S. E.; MIRANDA, A. S.; RACHID, M. A. PAPEL DO RECEPTOR 1 DO TNF NA ENCEFALOPATIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL In: IV Encontro de Patologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte.

6. SILVA, D. G.; CARVALHO, I. L. Q.; SANTOS, B. S.; CAMPOS, M. A.; **OLIVEIRA, B. S.**; CAMARGOS, Q. M.; STANCIOLI, E. F. B.; MIRANDA, A. S.; RACHID, M. A. PARTICIPAÇÃO DOS TLRs 3/7/9 NA MENINGOENCEFALITE POR HERPESVÍRUS BOVINO 5 EM CAMUNDONGOS. In: IV Encontro de Patologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte.

7. **OLIVEIRA, B. S.**; ROCHA, N. P.; FERREIRA, R. N.; MACHADO, C. A.; ABREU, L. K. S.; ALEXANDRE, C. H.; MARTINELLI, P. M.; RACHID, M. A.; CARMAGOS, E. S.R.; SILVA, A. C. S. E.; TEIXEIRA, A. L.; MIRANDA, A. S. ROLE OF RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM IN NON-MOTOR SYMPTOMS OF PARKINSON'S DISEASE In: Fourth International Symposium on Inflammatory Diseases - INFLAMMA IV, 2018, Belo Horizonte.

8. FLORINDO, R.; MACHADO, C. A.; **OLIVEIRA, B. S.**; FERREIRA, R. N.; ROCHA, N. P.; SILVA, A. C. S. E.; MIRANDA, A. S.; TEIXEIRA, A. L.; MARTINELLI, P. M.; CARMAGOS, E. S.R. BEHAVIORAL SYMPTOMS ARE ASSOCIATED WITH NEUROINFLAMMATORY PROCESSES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE In: V Simpósio de Integração do Programas de Pós Graduação em Biologia Celular UFMG, UFV, UFU e UFSJ; VIII Simpósio de Biologia Celular da UFMG - Prof.a Cleida Aparecida de Oliveira, 2017, Belo Horizonte.

9. **OLIVEIRA, B. S.**; ROCHA, N. P.; FERREIRA, R. N.; FLORINDO, R.; MACHADO, C. A.; ABREU, L. K. S.; ALEXANDRE, C. H.; MARTINELLI, P. M.; RACHID, M. A.; CARMAGOS, E. S.R.; SILVA, A. C. S. E.; TEIXEIRA, A. L.; MIRANDA, A. S. EFFECT OF RENIN ANGIOTENSIN SYSTEM IN ANXIETY LIKE BEHAVIOR IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF PARKINSON'S DISEASE In: V Simpósio de Integração do Programas de Pós Graduação em Biologia Celular UFMG, UFV, UFU e UFSJ; VIII Simpósio de Biologia Celular da UFMG - Prof.a Cleida Aparecida de Oliveira

10. ABREU, L. K. S.; VIEIRA, E. L.; BRANT, F.; VIEIRA, L. B.; ROCHA, N. P.; **OLIVEIRA, B. S.**; MACHADO, C. A.; ALEXANDRE, C. H.; MACHADO, F. S.;

RACHID, M. A.; TEIXEIRA, A. L.; MIRANDA, A. S. EFFECT OF THE GLUTAMATE RECEPTOR ANTAGONIST MK801 ON BRAIN INFILTRATING LYMPHOCYTES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CEREBRAL MALARIA In: V Simpósio de Integração do Programas de Pós Graduação em Biologia Celular UFMG, UFV, UFU e UFSJ; VIII Simpósio de Biologia Celular da UFMG - Prof.a Cleida Aparecida de Oliveira, 2017, Belo Horizonte.

11. ABREU, L. K. S.; VIEIRA, E. L.; FERREIRA, R. N.; BRANT, F.; VIEIRA, L. B.; ROCHA, N. P.; **OLIVEIRA, B. S.**; MACHADO, C. A.; ALEXANDRE, C. H.; MACHADO, F. S.; RACHID, M. A.; TEIXEIRA, A. L.; MIRANDA, A. S. EFFECT OF THE GLUTAMATE RECEPTOR ANTAGONIST MK801 ON BRAIN INFILTRATING LYMPHOCYTES IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF CEREBRAL MALARIA In: XXVI Semana de Iniciação Científica, 2017, Belo Horizonte.

12. ALEXANDRE, C. H.; TEIXEIRA, A. L.; SILVA, A. C. S. E.; RACHID, M. A.; CARMAGOS, E. S.R.; FERREIRA, R. N.; FERACIN, V.; CORDEIRO, T. M.; ABREU, L. K. S.; **OLIVEIRA, B. S.**; MACHADO, C. A.; MIRANDA, A. S. LATE AXIETY-LIKE BEHAVIOR IN MICE FOLLOWING MILD TRAUMATIC BRAIN INJURY:PRELIMINARY RESULT In: XXVI Semana de Iniciação CientíficaXXVI Semana de Iniciação Científica. , 2017.

13. OLIVEIRA, T. P. D.; GOLNCALVES, B. D. C.; **OLIVEIRA, B. S.**; MIRANDA, A. S.; AGUIAR, D. C.; RIBEIRO, F. M.; VIEIRA, L. B.O EFEITO DO MODULADOR ALOSTERICO NEGATIVO DO RECEPTOR METABOTROPICO DE GLUTAMATO DO SUBTIPO 5 NO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS OBESOS E

A SUA ATIVIDADE IN VIVO EM MODELOS COMPORTAMENTAIS In: XXV Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia - UFMG, 2017, Belo Horizonte.

Anexo A

Decisão Final - Aprovado - Protocolo CEUA: 255/2017 (CEUA-UFMG)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 255/2017

Título do projeto: Estudo do Papel dos Componentes do Sistema Renina-Angiotensina nos Sintomas não Motores da Doença de Parkinson

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Aline Silva de Miranda

Unidade: Instituto de Ciências Biológicas

Departamento: Departamento de Morfologia

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 30/10/2017. Validade: 30/10/2017 à 29/10/2022

Belo Horizonte, 31/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de [Minas Gerais](#)
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br