

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

BÁRBARA ZUCCOLOTTO SCHNEIDER GUIMARÃES PARREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE SINUCLEINOPATIA INDUZIDA POR
LPS: INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NAS VIAS DO INFLAMASSOMA E DAS
CHAPERONAS**

BELO HORIZONTE

2024

BÁRBARA ZUCCOLOTTO SCHNEIDER GUIMARÃES PARREIRA

**CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO DE SINUCLEINOPATIA INDUZIDA POR
LPS: INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES NAS VIAS DO INFLAMASSOMA E DAS
CHAPERONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Neurociências.

Área de Concentração: Neurociências Básicas

Linha de Pesquisa: Neuroimunologia

Orientadora: Profa. Aline Silva de Miranda (ICB-UFMG)

Co-orientadora: Profa. Paula Luciana Scalzo (ICB-UFMG)

BELO HORIZONTE

2024

043

Parreira, Bárbara Zuccolotto Schneider Guimarães.

Caracterização de um modelo de sinucleinopatia induzida por LPS: investigação de alterações nas vias do inflamassoma e das chaperonas [manuscrito] / Bárbara Zuccolotto Schneider Guimarães Parreira. – 2024.

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

Orientador: Aline Silva de Miranda. Coorientador: Paula Luciana Scalzo.

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

1. Neurociências. 2. Sinucleinopatias. 3. Doença de Parkinson. 4. Lipopolissacarídeos. 5. Modelos Animais. I. Miranda, Aline Silva de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612.8



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA
BÁRBARA ZUCCOLOTTO SCHNEIDER GUIMARÃES

Realizou-se, no dia 04 de abril de 2024, às 14:00 horas, sala Nelo Rangel K3-163 - ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, a 236ª defesa de dissertação, intitulada *Caracterização de um Modelo de Sinucleinopatia induzida por LPS: Investigação de alterações nas Vias do Inflamassoma e das Chaperonas*, apresentada por BÁRBARA ZUCCOLOTTO SCHNEIDER GUIMARÃES PARREIRA, número de registro 2021711328, graduada no curso de ENFERMAGEM, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em NEUROCIÊNCIAS, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Aline Silva de Miranda - Orientadora (UFMG), Profa. Paula Luciana Scalzo - Coorientadora (UFMG), Prof. Victor Rodrigues Santos (UFMG), Prof. Brener Cunha Carvalho (UFMG).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 04 de abril de 2024.

Profa. Aline Silva de Miranda (Doutora)

Profa. Paula Luciana Scalzo (Doutora)

Prof. Victor Rodrigues Santos (Doutor)

Prof. Brener Cunha Carvalho (Doutor)



Documento assinado eletronicamente por **Brener Cunha Carvalho, Usuário Externo**, em 05/04/2024, às 16:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Silva de Miranda, Servidor(a)**, em 06/04/2024, às 19:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor(a)**, em 12/04/2024, às 11:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paula Luciana Scalzo, Professora do Magistério Superior**, em 19/04/2024, às 01:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3058649** e o código CRC **310C75EC**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço

Ao amor que me permite enxergar o lado bom mesmo nas situações mais desafiadoras.

Ao amor de Deus, que me permite viver e superar todos os desafios.

Ao amor incondicional da minha mãe, que me permitiu seguir no mestrado, sendo minha maior rede de apoio.

Ao amor do meu filho Benjamin, que me motiva a superar desafios, a seguir, a aprender, a crescer e a crer no que parece impossível.

Ao amor do meu marido Daniel, que é exemplo de bondade e inteligência, fonte de inspiração, que sonha junto comigo com um futuro melhor, que compartilha as tristezas e alegrias e me motiva a seguir.

Ao amor do meu pai, que me conduz em momentos difíceis e me traz esperança.

Ao amor da minha amiga Rafaela, que compartilha momentos desafiadores e me traz esperança, é inspiração e orgulho, um exemplo de disciplina com bom humor.

Ao amor da minha orientadora Aline pela ciência, fonte de inspiração, que me recebeu no grupo e me possibilitou tantas oportunidades.

Ao amor dos meus colegas de laboratório, que me ensinam tanto, que compartilharam vida e boas memórias, me acolhem nos momentos difíceis e tornam meu mestrado mais leve e divertido. E, por último,

Ao amor de mãe, que tudo vence.

Meu maior desejo é que mais mães tenham a oportunidade de escolher seus futuros, em especial as mães de filhos atípicos, cuja caminhada é mais longa e, por vezes, mais árdua. Que todas nós encontremos suporte e que as instituições cresçam em justiça e equidade, de modo que nenhuma mãe precise abandonar seus sonhos. Que mais mães façam Ciência!

RESUMO

Introdução: Sinucleinopatias são um conjunto de distúrbios neurodegenerativos caracterizados por acúmulo de agregados tóxicos da proteína alfa-sinucleína no sistema nervoso central, sendo a Doença de Parkinson (DP) a mais prevalente entre elas. Investigar a fase prodrômica da DP é de grande relevância, tendo em vista que essa fase acontece anteriormente à clássica neurodegeneração nigro-estriatal. A ativação contínua do inflamassoma, um complexo proteico envolvido na regulação da resposta imune inata, está associada a distúrbios neurodegenerativos e sua desregulação pode alterar também a via das chaperonas, um conjunto de proteínas citoplasmáticas que desempenham um papel central na manutenção da proteostase celular. Estudos recentes destacam que a rede de conexões entre as proteínas da via da chaperonas está alterada em estados fisiopatológicos. Essas alterações parecem favorecer a progressão de vários tipos de tumores e da Doença de Alzheimer. Nesse contexto, torna-se relevante investigar possíveis alterações nessas vias em um modelo prodrômico de sinucleinopatia.

Objetivo: Caracterizar modelo de sinucleinopatia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) investigando o desenvolvimento de alterações comportamentais e clínicas na fase prodrômica, bem como alterações nas vias do inflamassoma e das chaperonas.

Métodos: Trata-se de um estudo experimental de sinucleinopatia em modelo murino aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG. Camundongos com idade entre 10-11 semanas foram divididos em dois grupos: LPS e Controle. O grupo LPS recebeu o lipopolissacarídeo *E. coli* 0111.4 (Sigma-Aldrich, EUA) sistemicamente, em doses diárias de 250 µg/kg/dia, por 7 dias consecutivos, enquanto o Grupo Controle recebeu solução salina 0,9% nas mesmas condições. Foram realizados testes comportamentais padronizados, análises de expressão em tempo real (RT-PCR) e ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em amostras do hipocampo, substância negra e estriado em dois momentos. Os dados foram analisados utilizando o Teste de Shapiro-Wilk, Teste T e Teste T de Welch, com nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados: O LPS causou perda de peso durante o período de indução (2º e 3º dias) e alterações comportamentais motoras até o 4º dia após a indução (dpi). Os animais do grupo LPS apresentaram alterações nos testes Barnes Maze e Labirinto em Y com 23 dpi, indicando prejuízos cognitivos. Em relação aos testes moleculares, observou-se um aumento da expressão de alfa-sinucleína total no 4º dpi, além de alterações das concentrações de mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos em ambos os momentos avaliados (4º e 23º dpi), dependentes da região cerebral avaliada. Os níveis de mRNA de componentes das vias do inflamassoma e das chaperonas também foram alterados após a administração do LPS.

Conclusões: O modelo LPS de sinucleinopatia demonstrou ser um modelo potencial para o estudo de alterações prodrômicas, potencialmente mediadas por alterações na via das chaperonas e do inflamassoma. Essas mudanças parecem ser região cerebral e tempo dependentes.

Palavras-chave: Sinucleinopatias, Doença de Parkinson, inflamassoma, chaperonas, modelo animal, lipopolissacarídeo.

ABSTRACT

Introduction: Synucleinopathies are a set of neurodegenerative disorders characterized by the accumulation of toxic aggregates of the alpha-synuclein protein in the central nervous system, with Parkinson's Disease (PD) being the most prevalent among them. Investigating the prodromal phase of PD is of great relevance, considering that this phase occurs prior to classic nigro-striatal neurodegeneration. The continuous activation of the inflammasome — a protein complex involved in the regulation of the innate immune response — is associated with neurodegenerative disorders and its deregulation can also alter the chaperone pathway, a set of cytoplasmic proteins that play a central role in maintaining cellular proteostasis. Recent studies highlight that the network of connections between chaperone pathway proteins is altered in pathophysiological states. These changes appear to favor the progression of various types of tumors and Alzheimer's disease. In this context, it is relevant to investigate possible changes in these pathways in a prodromal model of synucleinopathy.

Objective: To characterize a model of lipopolysaccharide (LPS)-induced synucleinopathy by investigating the development of behavioral and clinical changes in the prodromal phase, as well as changes in the inflammasome and chaperone pathways.

Methods: This is an experimental study of synucleinopathy in a murine model approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at UFMG. Mice aged 10-11 weeks were divided into two groups: LPS and Control. The LPS group received the lipopolysaccharide *E. coli* 0111.4 (Sigma-Aldrich, USA) systemically, in daily doses of 250µg/kg/day, for 7 consecutive days, while the Control Group received 0.9% saline solution under the same conditions. Standardized behavioral tests, real-time expression analysis (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) were performed on samples from the hippocampus, substantia nigra and striatum at two moments. Data were analyzed using the Shapiro-Wilk Test, T Test and Welch T Test, with a significance level of $p < 0.05$.

Results: LPS caused weight loss during the induction period (2nd and 3rd days) and motor behavioral changes until the 4th day after induction (dpi). Animals in the LPS group showed changes in the Barnes Maze and Y-maze tests at 23 dpi, indicating cognitive impairments. Regarding molecular tests, an increase in the expression of total alpha-synuclein was observed on the 4th dpi, in addition to changes in the concentrations of inflammatory mediators and neurotrophic factors at both moments evaluated (4th and 23rd dpi), depending on the brain region evaluated. The mRNA levels of components of the inflammasome and chaperone pathways were also altered after LPS administration.

Conclusions: The LPS model of synucleinopathy demonstrated to be a potential model for the study of prodromal changes, potentially mediated by alterations in the chaperone and inflammasome pathway. These changes appear to be brain region and time dependent.

Keywords: Synucleinopathies, Parkinson' disease, inflammasome, chaperones, animal model, lipopolysaccharide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estados conformacionais da α -syn.....	22
Figura 2 - Ilustração-esquema do monômero de α -syn.....	24
Figura 3 - Acúmulo de α -syn nos terminais pré-sinápticos e sinaptopatia.	26
Figura 4 - Diferenças entre os sistemas de depuração Proteossomal e de Autofagia.....	31
Figura 5 - Estadiamento, proposto por Braak, da Doença de Parkinson.....	37
Figura 6 - Subtipos de Doença de Parkinson: uma hipótese.....	38
Figura 7 - Modelo esquemático da indução.....	54
Figura 8 - Modelo resumo do desenho experimental utilizado.....	55
Figura 9 - Esteriotipias relacionadas ao estresse em murinos.....	57
Figura 10 - Arena do Teste de Campo Aberto.....	57
Figura 11 - Teste de Força de Prensão. Adaptado de (Nordmann, 1985).....	58
Figura 12 - Teste Wire Hang. Adaptado de (Nordmann, 1985).....	59
Figura 13 - Teste de Remoção de Adesivo.....	60
Figura 14 - Ilustração Aparato Rotarod.....	61
Figura 15 - Ilustração-esquema Teste Barnes Maze.....	62
Figura 16 - Aparato Teste Esquiva Inibitória.....	63
Figura 17 - Aparato Teste do Labirinto em Y.....	64
Figura 18 - Aparato do Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras.....	65

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeitos do LPS na peso e na distância total percorrida no OPF.....	71
Gráfico 2 - Efeitos do LPS na distância total percorrida no OPF.....	72
Gráfico 3 - Efeitos do LPS no desempenho do Teste de Labirinto de Barnes e Teste do Labirinto em Y.....	73
Gráfico 4 - Efeitos do LPS na expressão de α -syn-total no hipocampo, substância negra e estriado no 4° dpi.....	74
Gráfico 5 - Expressão de mRNA do gene SNCA no hipocampo, substância negra e estriado com 23 dpi.....	74
Gráfico 6 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Hipocampo no 4° dpi.....	76
Gráfico 7 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Estriado no 4° dpi.....	77
Gráfico 8 - Perfil das dosagens de Citocinas e Quimiocinas na Substância Negra com 4 dpi.	78
Gráfico 9 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Hipocampo no 23° dpi.....	79
Gráfico 10 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Estriado no 23° dpi.....	79
Gráfico 11 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas na Substância Negra no 23° dpi.....	80
Gráfico 12 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo no 4° dpi.....	81
Gráfico 13 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no estriado com 4 dpi.....	81
Gráfico 14 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias na substância negra com 4 dpi.....	82
Gráfico 15 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo no 23° dpi.....	83
Gráfico 16 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no estriado no 23° dpi.....	83
Gráfico 17 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias na substância negra no 23° dpi.....	84
Gráfico 18 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Hipocampo no 4° dpi.....	85
Gráfico 19 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Estriado no 4° dpi.....	86

Gráfico 20 - Perfil das dosagens de Fatores Neurotróficos na Substância Negra com 4 dpi....	87
Gráfico 21 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Hipocampo no 23° dpi.....	88
Gráfico 22 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Estriado no 23° dpi.....	88
Gráfico 23 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos na Substância Negra no 23° dpi. .	89
Gráfico 24 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes do Inflamassoma no Hipocampo no 4° dpi.....	90
Gráfico 25 - Concentração dos níveis de mRNA de NLRP3, ASC e CASP1 no estriado com 4 dpi.....	90
Gráfico 26 - Concentração dos níveis de mRNA de NLRP3, ASC e CASP1 na substância negra com 4 dpi.....	91
Gráfico 27 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 no hipocampo com 4 dpi.....	91
Gráfico 28 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 no estriado com 4 dpi.....	92
Gráfico 29 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 na Substância Negra no 4° dpi	92
Gráfico 30 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes do Inflamassoma no Hipocampo no 23° dpi.....	93
Gráfico 31 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes do Inflamassoma no Estriado no 23° dpi.....	94
Gráfico 32 - Concentração dos níveis de mRNA de NLRP3, ASC e CASP1 na substância negra com 23 dpi.....	94
Gráfico 33 - Concentração dos níveis de mRNA do NF-kB no Hipocampo no 23° dpi.....	95
Gráfico 34 - Concentração dos níveis de mRNA do NF-kB no Estriado no 23° dpi.....	95
Gráfico 35 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 na substância negra com 23 dpi	96
Gráfico 36 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP40, HSP70-1 e HSP70-3 no hipocampo com 4 dpi.....	97
Gráfico 37 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas na Substância Negra no 4° dpi.....	97
Gráfico 38 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas no Estriado com 4 dpi.....	98
Gráfico 39 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no hipocampo com 4 dpi.....	98

Gráfico 40 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no estriado com 4 dpi	99
Gráfico 41 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas na Substância Negra no 4º dpi	99
Gráfico 42 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas no Hipocampo com 23 dpi	100
Gráfico 43 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas no Estriado com 23 dpi	100
Gráfico 44 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas na Substância Negra no 23º dpi	100
Gráfico 45 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no hipocampo com 23 dpi	101
Gráfico 46 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 na substância negra com 23 dpi	101
Gráfico 47 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no estriado com 23 dpi	102
Gráfico 48 - Teste de Remoção de Adesivo de Ponta Nasal para detecção de alteração na coordenação motora fina realizado no 2º dia de indução	128
Gráfico 49 - Teste de Remoção de Adesivo de Ponta Nasal para detecção de alteração na coordenação motora fina realizado no 1º dpi	129
Gráfico 50 - Grip Force Test aplicado para avaliar alteração da força de tração dos animais, teste realizado no 7º dia de indução	129
Gráfico 51 - Grip Force Test aplicado para avaliar alteração da força de tração dos animais, teste realizado no 54º dpi	130
Gráfico 52 - Wire Hang Test aplicado no 1º dpi para detectar anormalidades musculares	130
Gráfico 53 - Wire Hang Test aplicando no 2º dpi para detectar possíveis anormalidades neuromusculares de força muscular nos animais	131
Gráfico 54 - Wire Hang Test aplicando no 16º dpi para detectar possíveis anormalidades neuromusculares de força muscular nos animais	131
Gráfico 55 - Wire Hang Test aplicando no 54º dpi para detectar possíveis anormalidades neuromusculares de força muscular nos animais	132
Gráfico 56 - Teste Rotarod para avaliar coordenação motora aplicado no 4º dpi	132

Gráfico 57 - Teste do Labirinto em Cruz elevado para avaliação de comportamento do tipo ansioso com 36 dpi.....	133
Gráfico 58 - Teste Marble Buried para avaliar comportamentos do tipo ansioso e compulsivo nos animais com 36 dpi.....	133
Gráfico 59 - Teste de discriminação olfativa para avaliar perda de olfato nos animais com 37 dpi.....	134
Gráfico 60 - Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras para explorar a sociabilidade dos animais com 38 dpi.....	134
Gráfico 61 - Teste da Esquiva Inibitória para avaliar memória associada a amígdala.....	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA – 6-Hidroxodopamina

AG – Aparelho de Golgi

AMS – Atrofia de Múltiplos Sistemas

BDNF – Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro

BHE – Barreira Hematoencefálica

CL – Corpos de Lewy

DA – Neurônios Dopaminérgicos

DAMPs: Padrões Moleculares Associados à Danos

DCL – Demência com Corpos de Lewy

DCLi – Demência com Corpos de Lewy Incidental

DDP – Demência da Doença de Parkinson

DEPC – Dietilpirocarbonato

DP – Doença de Parkinson

DPI – Dia(s) Após a Indução

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

FNT – Fatores Neurotróficos

GDNF – Fator Neurotrófico Derivado da Glia

HSP – Proteínas de Choque Térmico

IAP – Insuficiência Autonômica Pura

LBP – Lipopolysacharide-Binging Protein

LPS – Lipopolissacarídeo

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

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

NL – Neuritos de Lewy

NOS – Espécies reativas de Oxigênio

PAMP: Padrões Moleculares Associados à Patógenos

RDP – Resposta à Proteína Desdobrada

RE – Retículo Endoplasmático

RT-PCR – Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia de Polimerase

SM – Sintomas Motores

SN – Substância Negra

SNA – Sistema Nervoso Autônomo

SNC – Sistema Nervoso Central

SNE – Sistema Nervoso Entérico

SNM – Sintomas Não Motores

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SNpc – Substância Negra *Pars Compacta*

VAL – Via de Autofagia-endolisossomal

α -syn – Alfa-sinucleína

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	SINUCLEINOPATIAS.....	19
2.1.1	Etiologia das Sinucleinopatias.....	21
2.1.2	Fisiopatologia das Sinucleinopatias.....	23
2.1.2.1	Sinaptopatia associada à patologia da α -syn.....	25
2.1.2.2	Disfunção mitocondrial associada à patologia da α -syn.....	27
2.1.2.3	Estresse Crônico de Retículo Endoplasmático associado à patologia da α -syn tóxica	28
2.1.2.4	Estresse do Aparelho de Golgi associado à patologia da α -syn.....	29
2.1.2.5	Alterações de depuração celular associadas à patologia da α -syn.....	30
2.2	DOENÇA DE PARKINSON.....	32
2.2.1	Etiologia.....	33
2.2.2	Fisiopatologia.....	34
2.2.2.1	Quadro Clínico.....	35
2.2.2.2	Alterações de Memória Hipocampal.....	38
2.3	NEUROINFLAMAÇÃO.....	40
2.4	INFLAMASSOMA.....	41
2.5	VIA DAS CHAPERONAS.....	42
2.6	CROSSTALK INFLAMASSOMA-CHAPERONAS.....	44
2.7	MODELOS ANIMAIS PARA DOENÇA DE PARKINSON.....	45
2.7.1	Modelo LPS de sinucleinopatia.....	47
3	JUSTIFICATIVA.....	50
4	HIPÓTESE.....	51
5	OBJETIVOS.....	52
5.1	OBJETIVO GERAL.....	52
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
6	MÉTODOS.....	53

6.1	APROVAÇÃO ÉTICA PARA ESTUDO EM ANIMAIS.....	53
6.2	ANIMAIS.....	53
6.3	MODELO MURINO DE SINUCLEINOPATIA.....	54
	55
6.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	56
6.4.1	Teste de Campo Aberto - (Open Field Test - OPF).....	56
6.4.2	Teste de Força de Preensão (Grip Force Test - GFT).....	57
6.4.3	Wire Hanging Test.....	58
6.4.4	Teste de Retirada de Adesivo de Ponta Nasal (Adhesive Removal Test).....	59
6.4.5	Teste Rotarod.....	60
6.4.6	Teste Barnes Maze.....	61
6.4.7	Teste da Esquiva Inibitória (Simple Inhibitory Avoidance).....	62
6.4.8	Teste do Labirinto em Y (Y Maze Test).....	63
6.4.9	Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras (Three-Chamber Sociability and Social Novelty Test).....	64
6.5	MEDIDAS DE EXPRESSÃO EM TEMPO REAL (RT-PCR).....	66
6.6	MEDIDAS DE COMPONENTES POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO.....	68
6.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	69
7	RESULTADOS.....	71
7.1	LPS INDUZ PERDA DE PESO E ALTERAÇÃO TRANSITÓRIA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA.....	71
7.2	LPS ALTERA MEMÓRIA HIPOCAMPAL E DE TRABALHO.....	73
7.3	EXPRESSÃO AUMENTADA DE A-SYN NO HIPOCAMPO.....	74
7.4	MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM REGIÕES CEREBRAIS. .	76
7.4.1	No 4º dia após a indução.....	76
7.4.2	No 23º dia após indução.....	78
7.5	LPS ALTERA A EXPRESSÃO DO RECEPTOR CX3CR1 E CITOCINAS.....	80
7.5.1	No 4º dia após a indução.....	80
7.5.2	No 23º dia após indução.....	82
7.6	REDUÇÃO DOS FATORES NEUROTROFICOS EM REGIÕES CEREBRAIS	
	84	
7.6.1	No 4º dia após a indução.....	84

7.6.2	No 23° dia após a indução.....	87
7.7	IMPACTO DO LPS NA VIA DO INFLAMASSOMA.....	89
7.7.1	No 4° dia após a indução.....	89
7.7.2	No 23° dia após a indução.....	93
7.8	IMPACTO DO LPS NA VIA DAS CHAPERONAS.....	96
7.8.1	No 4° dia após a indução.....	96
7.8.2	No 23° dia após a indução.....	100
8	DISCUSSÃO.....	104
9	CONCLUSÃO.....	110
10	REFERÊNCIAS.....	111
11	APÊNDICES.....	129
12	ANEXO.....	137

1 INTRODUÇÃO

As sinucleinopatias são distúrbios neurodegenerativos de grande relevância epidemiológica, caracterizados pela presença de agregados proteicos conhecidos como Corpos de Lewy (CL), seus marcadores histopatológicos (COON; SINGER, 2020). Embora a alfa-sinucleína (α -syn) seja reconhecida como o componente principal dos CL, eles possuem outros constituintes, incluindo proteínas de choque térmico do sistema de chaperonas (WAKABAYASHI et al., 2013). A neuroinflamação, evidenciada por elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro e líquido cefalorraquidiano, bem como pela intensa ativação microglial no parênquima cerebral dos pacientes, é outra característica proeminente de doenças neurodegenerativas (LIU; CHEN; CHANG, 2022).

No contexto da neuroinflamação, a ativação desregulada do inflamassoma, um complexo proteico envolvido na regulação da resposta imune inata, já foi associada a doenças neurodegenerativas e, mais recentemente, alterações na via das chaperonas também têm sido associadas a esses distúrbios. (JO et al., 2016; RODINA et al., 2016). As chaperonas desempenham um papel crucial na manutenção do equilíbrio proteostático intracelular, mas sob condições de estresse celular, podem adotar um estado alterado, conhecido como epichaperoma, capaz de estabilizar proteínas mal dobradas e contribuir para a progressão de condições patológicas (KISHINEVSKY et al., 2018).

O escopo deste estudo abrange a validação de um modelo de sinucleinopatia, com ênfase na investigação da possível ativação desregulada do inflamassoma e das chaperonas nesse contexto. O modelo selecionado para esta investigação é aquele induzido por lipopolissacarídeo (LPS), escolhido estrategicamente devido à sua capacidade de operar como um primeiro sinal para a via do inflamassoma e, posteriormente, pela formação de alfa-sinucleína tóxica, agir como um segundo sinal, essencial para a montagem e ativação do complexo do inflamassoma.

Destaca-se, ainda, que o modelo escolhido apresenta alterações cognitivas precoces, possibilitando a investigação das vias do inflamassoma e das chaperonas na fase prodrômica, o que é crucial, visto que intervenções nesse estágio inicial podem contribuir para um melhor prognóstico desses distúrbios no futuro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SINUCLEINOPATIAS

As sinucleinopatias são um conjunto de desordens neurodegenerativas que possuem como característica central a presença de agregados malformados da proteína alfa-sinucleína (Coon & Singer, 2020). A depender da região neuroanatômica, do subtipo celular envolvido – neuronal e/ou glial – e do padrão de deposição da α -syn haverá um perfil fenotípico diferente, distinguindo cada uma das desordens que compõem esse grupo de doenças (Alegre-Abarrategui et al., 2019).

Existem dois grupos principais de sinucleinopatias, das Doenças dos Corpos de Lewy, com agregados proteicos no pericário e em neuritos de neurônios do sistema nervoso central, e da Atrofia de Múltiplos Sistemas (AMS), cujos agregados estão principalmente nos oligodendrócitos (FELLNER et al., 2021; KOGA et al., 2021). Entretanto, o acúmulo de α -syn também pode se iniciar no sistema nervoso autônomo, nesse caso sendo denominada como Insuficiência Autonômica Pura (IAP). Em alguns pacientes, a IAP pode progredir com alterações centrais, normalmente motoras e cognitivas, nesse caso evoluindo para outro diagnóstico, como o de Doença de Parkinson (DP), Demência com Corpos de Lewy (DCL) ou AMS (NYU LANGONE HEALTH, 2022).

À medida que os estudos sobre as desordens neurodegenerativas avançaram, descobertas relacionadas à presença de inclusões intracelulares foram sendo feitas. Em 1912, Friedrich Heinrich Lewy, um neurologista alemão, descreveu pela primeira vez a presença de corpos de inclusão em neurônios do núcleo dorsal do vago, e em outros núcleos, em cérebros de indivíduos com DP (ENGELHARDT, 2017a). Essas inclusões eosinófilas e insolúveis em álcool, clorofórmio e benzeno indicavam a presença de um componente proteico, posteriormente identificado como sendo a alfa-sinucleína (Goedert et al., 2013).

No ano seguinte à descoberta de Lewy, o neuropatologista espanhol Gonzalo Rodriguez Lafora nomeou essas inclusões como Corpos de Lewy e postulou que a existência de várias classes de corpos amiláceos no sistema nervoso está associada às doenças neurodegenerativas (ENGELHARDT, 2017b; RODRIGUES E SILVA et al., 2010). Em 1976, o psiquiatra japonês Kosaka e seus colaboradores descreveram um novo tipo de demência, destacando a presença expressiva de CL concomitante a outras alterações neurodegenerativas (KOSAKA et al., 1976).

Esse achado levou o grupo a intensificar as investigações e posteriormente cunhar o termo “Doença dos Corpos de Lewy”, para designar doenças neurodegenerativas com numerosos CL, classificando-as em três subtipos: predominante no Tronco Cerebral [correspondendo à DP], Difusa [uma extensão da DP no lobo límbico e neocórtex], Transicional [lobo límbico] e Cerebral [com numerosos CL no córtex cerebral e amígdala, mas poucos no tronco cerebral e diencéfalo] (KOGA et al., 2021).

Posteriormente, descobriu-se que os CL também estão presentes fora do Sistema Nervoso Central (SNC) e Periférico (SNP), sendo identificados no plexo mioentérico esofágico de pacientes com acalasia, um distúrbio no qual os movimentos peristálticos do esôfago estão ausentes ou comprometidos, bem como em pacientes com DP que apresentam disfagia. Essa observação sugere a possibilidade de compartilhamento de mecanismos semelhantes de degeneração neuronal na disfunção esofágica entre esses subgrupos de pacientes (Qualman et al., 1984). Por fim, em 1997, após ser geneticamente relacionada à DP e como fator de risco para AMS, a α -syn começou a ser ainda mais extensamente investigada (Brás et al., 2020a; Goedert et al., 2013).

O acompanhamento longitudinal de pacientes com sinucleinopatias tem revelado que sinais e sintomas não clássicos antecedem o início da sintomatologia clássica dessas desordens por décadas antes do diagnóstico clínico, sendo esse estágio denominado como fase prodrômica. Cientistas têm se aprofundado na investigação dessa fase com o objetivo de aprimorar a compreensão da progressão desses distúrbios e dos fatores predisponentes associados. A busca por novos marcadores visa a melhorar a acurácia diagnóstica e desenvolver tratamentos modificadores do curso dessas doenças (BERG et al., 2021; HILKER et al., 2005; KIRCHHOF et al., 2003; LEE et al., 2022; STIASNY-KOLSTER et al., 2005). Algumas alterações prodrômicas já foram identificadas, tais como disfunção olfatória (hiposmia), constipação intestinal, distúrbios de ansiedade e depressão, alteração do sono REM, hipotensão ortostática, entre outras (CLAASSEN et al., 2010; GOTO et al., 2000; PONSEN et al., 2004; XIA; POSTUMA, 2020). A investigação da fase prodrômica desempenha um papel crucial na identificação precoce das sinucleinopatias, contribuindo para intervenções terapêuticas mais eficazes e abrindo caminho para estratégias de manejo preventivo.

Epidemiologicamente, a DP destaca-se como a sinucleinopatia mais prevalente, atraindo a maior parte dos estudos, seguida pela DCL, Demência da Doença de Parkinson (DDP) e Demência com Corpos de Lewy Incidental (DCLi), referindo-se a indivíduos com CL assintomáticos (Savica et al., 2018). A DP é a segunda desordem neurodegenerativa mais comum no mundo e sua prevalência aumenta com o envelhecimento populacional, estimando-se em 0,3% na população

geral, ~1% na população acima de 60 anos e ~3% na população acima de 80 anos (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018a).

A DCL é o segundo subtipo de demência mais prevalente, com uma taxa de ~0,36% na população com mais de 65 anos (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018b). A prevalência de DDP entre os pacientes é de 30% e está diretamente relacionada ao tempo diagnóstico, podendo atingir uma prevalência de 83% em pessoas diagnosticadas há 20 anos (ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018a).

Apesar de apresentar uma prevalência consideravelmente menor quando comparada às outras sinucleinopatias (3,4 - 4,9 por 100.000 pessoas/ano), a AMS é uma condição mais grave, com uma sobrevida média de 6 a 10 anos após o diagnóstico (LEE et al., 2019). Além disso, a AMS exibe uma maior variação etária, podendo acometer indivíduos a partir dos 31 anos de idade (COON et al., 2015; ERKKINEN; KIM; GESCHWIND, 2018a).

2.1.1 Etiologia das Sinucleinopatias

O padrão e a progressão da neurodegeneração nas sinucleinopatias ocorrem concomitantemente à patologia da α -syn, cujos oligômeros induzem neurotoxicidade e se disseminam de célula a célula, características essas que os colocam como componente central na etiologia desses distúrbios (CASCELLA et al., 2022).

A α -syn, transcrita do gene *SNCA*, está presente em organelas, no núcleo e nas membranas celulares de células cerebrais, além de ocorrer em outros órgãos, como intestino e coração, e no tecido sanguíneo (Poewe et al., 2017). Essa proteína é expressa preferencialmente nas membranas pré-sinápticas de neurônios, sendo uma das mais abundantes no cérebro. Embora sua função fisiológica ainda não esteja completamente elucidada, sabe-se que desempenha um papel relevante no tráfego de vesículas sinápticas, na manutenção da homeostase sináptica, na montagem do complexo SNARE (complexo proteico envolvido na liberação de neurotransmissores) e na neuroplasticidade (KOGA et al., 2021; MEHRA; SAHAY; MAJI, 2019; SULZER; EDWARDS, 2019).

Em condições fisiológicas, a α -syn coexiste em um equilíbrio dinâmico em variadas conformações moleculares (Figura 1), incluindo estruturas monoméricas, oligoméricas e fibrilares, que se interconvertem conforme as mudanças no ambiente celular (ALEGRE-ABARRATEGUI et al., 2019; LONGHENA et al., 2017). Em certas condições celulares há uma propensão à

oligomerização da α -syn em inclusões fibrilares maiores, como os CL, o que pode culminar em citotoxicidade (Bernal-Conde et al., 2019).

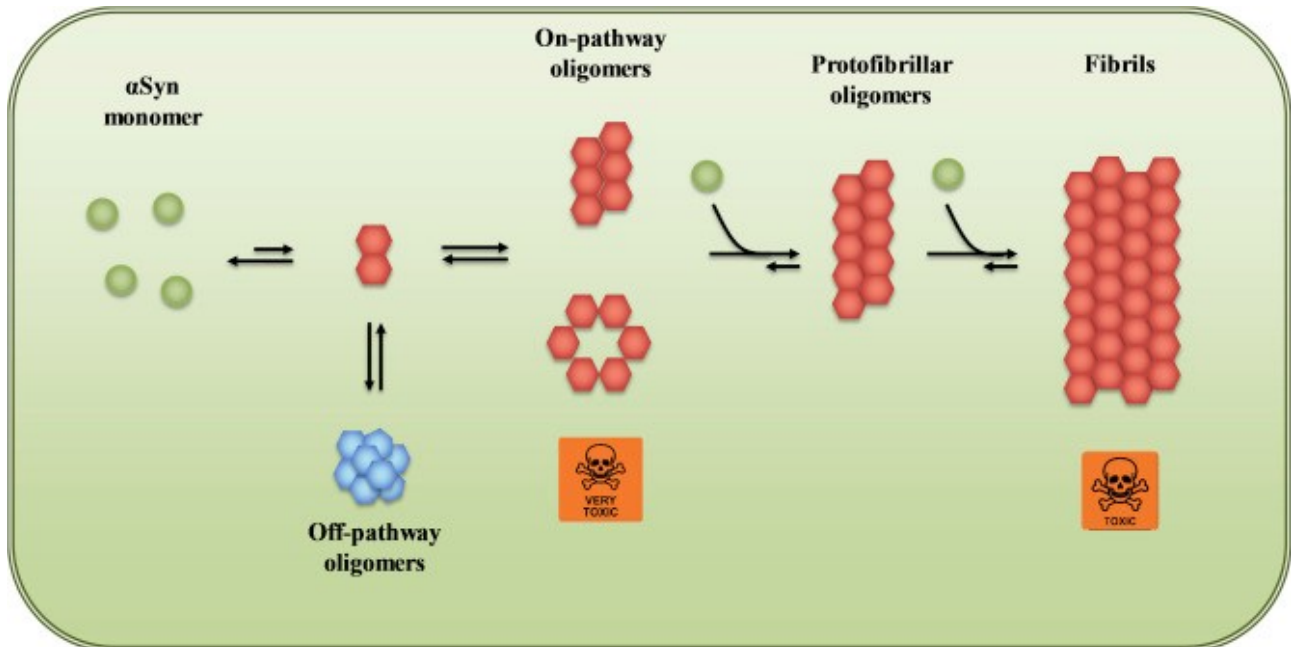


Figura 1 - Estados conformacionais da α -syn. Fonte: adaptada de (Oliveri, 2019). As formas monoméricas de α -syn interagem entre si e podem se apresentar em diversos estados conformacionais, sendo que alguns estados oligoméricos e fibrilares tóxicos contribuem para a neurodegeneração.

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o dobramento incorreto e a agregação da α -syn são eventos centrais nas sinucleinopatias, resultando inicialmente na formação de espécies pré-fibrilares malformadas [oligômeros], que eventualmente constituem os agregados fibrilares insolúveis associados a essas patologias (MEHRA; SAHAY; MAJI, 2019). Apesar dos esforços em descrever como diferentes conformações oligoméricas podem perturbar a homeostase e suas respectivas toxicidades, ainda não está bem estabelecido quando e em que grau cada espécie de oligômero se torna patogênica, embora alguns efeitos deletérios já estejam bem descritos (VILLAR-PIQUÉ; LOPES DA FONSECA; OUTEIRO, 2016). Há evidências sugerindo que, enquanto os oligômeros malformados, que são moléculas instáveis e heterogêneas, são altamente neurotóxicos, as fibrilas parecem ter um potencial para propagar e disseminar a patologia pelo tecido (MEHRA; SAHAY; MAJI, 2019).

Apesar dos CL serem compostos por mais de 90 moléculas, evidências destacam a relevância da α -syn entre esses componentes. Mutações pontuais no gene da α -syn conduzem a uma forma autossômica dominante de DP e duplicações e triplicações do gene selvagem causam uma forma grave de DP, sugerindo que o simples aumento da sua expressão é suficiente para

desencadear a patologia idiopática (SULZER; EDWARDS, 2019; WAKABAYASHI et al., 2013). Algumas mutações associadas à superexpressão, ao mal dobramento e a alterações nas vias de depuração levam à formação e deposição de oligômeros de α -syn. Entretanto, ainda não está claro quais eventos, pré ou pós-traducionais, desencadeiam a patologia e porque ela não ocorre de maneira generalizada no sistema nervoso, mas parece restrita a alguns subconjuntos de células (POEWE et al., 2017).

A observação de que as sinucleinopatias afetam o parênquima cerebral de modo heterogêneo instiga investigações sobre as particularidades desses sítios, de suas vias metabólicas e especificidades em seus estados de homeostasia. Outra perspectiva é explorar o que torna as regiões adjacentes protegidas. Nesse contexto, hipóteses relacionadas à ativação da patologia têm sido levantadas. In vitro, parâmetros como alterações de pH e concentração de sal determinam padrões distintos de agregados de α -syn, conduzindo a efeitos biológicos diversos (BRÁS; OUTEIRO, 2021). In vivo, a microbiota tem sido objeto de investigações devido à sua capacidade de migrar para novos sítios e liberar metabólitos que, em algumas circunstâncias, podem alcançar o SNC e induzir neuroinflamação (SAMPSON et al., 2016). Fatores exógenos e ambientais, como exposição a neurotoxinas (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), Paraquat e Rotenona), alguns metais pesados, traumatismo cranioencefálico e distúrbios do sono também estão entre as hipóteses investigadas (ALEGRE-ABARRATEGUI et al., 2019; BERNAL-CONDE et al., 2019; BRÁS et al., 2020b; KOGA et al., 2021).

2.1.2 Fisiopatologia das Sinucleinopatias

O mecanismo fisiopatológico subjacente às sinucleinopatias ainda não foi completamente elucidado. Três isoformas de sinucleínas são descritas no corpo humano, denominadas α , β e γ . As isoformas α e β são encontradas nas membranas pré-sinápticas de neurônios, enquanto a conformação γ é encontrada em células gliais e em alguns grupos neuronais específicos, incluindo os neurônios dopaminérgicos (BENDOR; LOGAN; EDWARDS, 2013). Contudo, apenas a isoforma α é encontrada nos CL e foi associada à patogênese da DP (BRIDI; HIRTH, 2018).

Composta por 140 aminoácidos, a α -syn possui um baixo peso molecular (~15 kDa) e é dividida em três regiões (N-terminal, NAC e C-terminal) (Figura 2), conferindo-lhe propriedades bioquímicas diversas, capacidade de adquirir variadas conformações e de se associar a outras moléculas, como lipídios e proteínas (ALEGRE-ABARRATEGUI et al., 2019). O domínio N-

terminal permite à α -syn interagir com membranas lipídicas e adquirir uma estrutura em α -hélice, e é nessa região que se encontram várias das mutações correlacionadas a DP (A30P, E46K, H50Q, G51D, A53E, A53T) (BRIDI; HIRTH, 2018; BURRÉ; SHARMA; SÜDHOF, 2014). O domínio NAC constitui a região central da proteína, rica em resíduos hidrofóbicos, tornando-a propensa à agregação e sendo chave na transformação da forma monomérica em oligômeros, protofibrilas e agregados fibrilares maiores (BRIDI; HIRTH, 2018; XIA et al., 2001). A região ácida C-terminal favorece a conformação desdobrada fisiológica, permitindo a interação com outras moléculas e, quando sofre mutações, também se torna altamente propensa à agregação (CROWTHER et al., 1998).

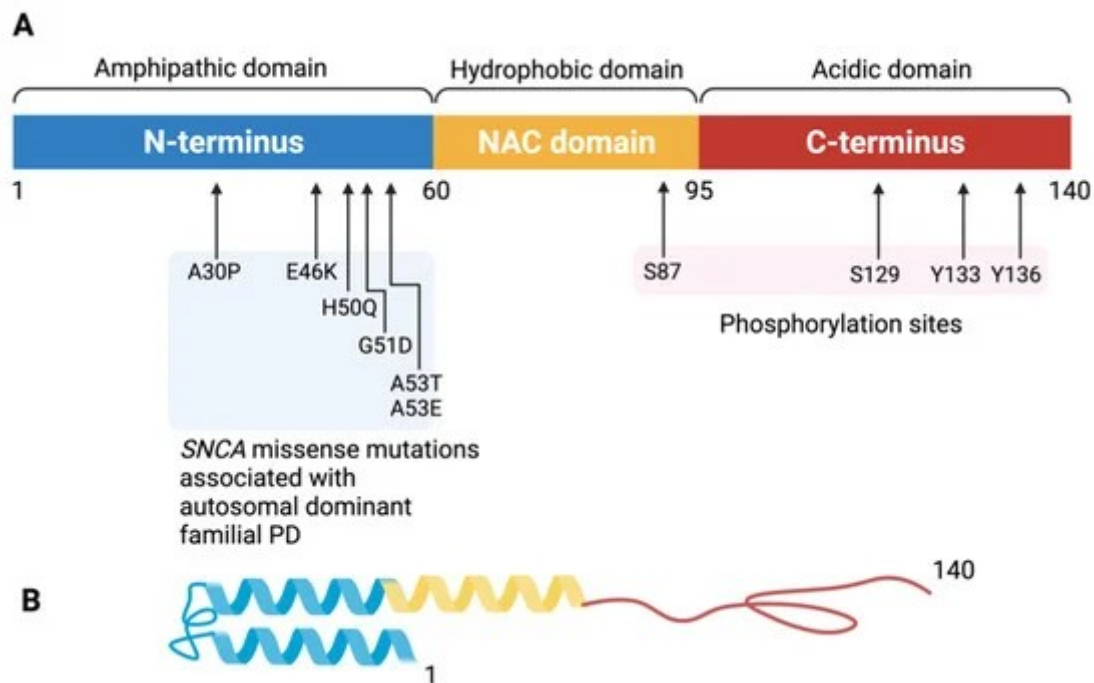


Figura 2 - Ilustração-esquema do monômero de α -syn. Adaptada de (Milde et al., 2021). (A) Domínio N-terminal, Domínio NAC e Domínio C-terminal. Todos com as principais mutações associadas a DP (B) Estrutura terciária do monômero de α -syn.

Fisiologicamente, há um equilíbrio entre as formas monoméricas citosólicas e insolúveis de membrana da α -syn, mantido pelos sistemas ubiquitina-proteassoma e de autofagia lisossomal mediada por chaperonas, ambos sistemas responsáveis pela depuração celular (BRÁS et al., 2020b; POEWE et al., 2017). Processos patológicos relacionados à oligomerização da α -syn já estão bem descritos, incluindo o acúmulo no terminal pré-sináptico causando sinaptopatia, prejudicando a condução do impulso nervoso e podendo levar à neurodegeneração de circuitos neuronais (BRIDI; HIRTH, 2018). Além disso, existem alterações no funcionamento de organelas citoplasmáticas, como o estresse crônico de retículo endoplasmático, disfunção mitocondrial, mudanças no trânsito

de vesículas associadas a modificações no complexo de Golgi e alterações na depuração celular devido a modificações lisossomais (COLLA et al., 2012; VILLAR-PIQUÉ; LOPES DA FONSECA; OUTEIRO, 2016). No núcleo, a α -syn é capaz de regular sua própria expressão, podendo favorecer também processos de oligomerização (BRÁS et al., 2020b). Os processos patológicos associados à oligomerização serão abordados brevemente neste trabalho, já que uma de nossas perspectivas será a co-localização por imunofluorescência da α -syn patogênica (fosforilada na serina 129) com regiões/estruturas cerebrais.

2.1.2.1 Sinaptopatia associada à patologia da α -syn

Uma das teorias mais aceitas sobre a função fisiológica da α -syn a retrata como um agente regulador da transmissão sináptica no terminal pré-sináptico (RAMIREZ et al., 2021; VILLAR-PIQUÉ; LOPES DA FONSECA; OUTEIRO, 2016). Nesse sentido, estudos demonstraram que a liberação de α -syn na fenda sináptica está diretamente relacionada à ativação de vias neurais, de modo que sua concentração no meio extracelular aumenta à medida que há um aumento do número de potenciais de ação disparados (JANG et al., 2010; LUNDBLAD et al., 2012; WU et al., 2010; YAMADA; IWATSUBO, 2018). Ao ser liberada na fenda sináptica, a α -syn é recaptada por neurônios e células gliais circundantes. No entanto, alterações na recaptação podem favorecer o aumento de sua concentração na fenda sináptica, levando à formação de oligômeros extracelulares e culminando em sinaptopatia associada à α -syn. Oligômeros presentes na fenda sináptica foram relacionados a alterações de potenciação de longa duração (associadas a alterações de memória), perturbações na transmissão sináptica glutamatérgica, indução da ativação inflamatória microglial e favorecimento da disseminação transcelular de espécies malformadas de α -syn (ALEGRE-ABARRATEGUI et al., 2019; YAMADA & IWATSUBO, 2018).

O comprometimento precoce da função sináptica é frequentemente encontrado nos distúrbios neurodegenerativos e geralmente acontece junto aos sintomas cognitivos nos estágios iniciais das doenças (BRIDI & HIRTH, 2018). Conforme a sinaptopatia associada à α -syn progride, observa-se uma evolução da patologia em direção ao pericário neuronal. Danos nas regiões sinápticas foram pioneiramente identificados por Braak e, posteriormente, também relatados por Kramer e Schulz-Schaeffer em 2007, observando uma maior abundância da proteína na região sináptica em comparação com outras regiões celulares. Isso demonstrou que 50-92% dos microagregados de α -syn estavam no terminal pré-sináptico (BRAAK et al., 1999; KRAMER;

SCHULZ-SCHAEFFER, 2007). Esses achados são condizentes com dados clínicos tomográficos em pacientes com DP, que indicam extenso dano axonal e perda de conectividade nas vias nigroestriatais já nos estágios iniciais da doença (BRIDI; HIRTH, 2018; DIJKSTRA et al., 2015) (Figura 3).

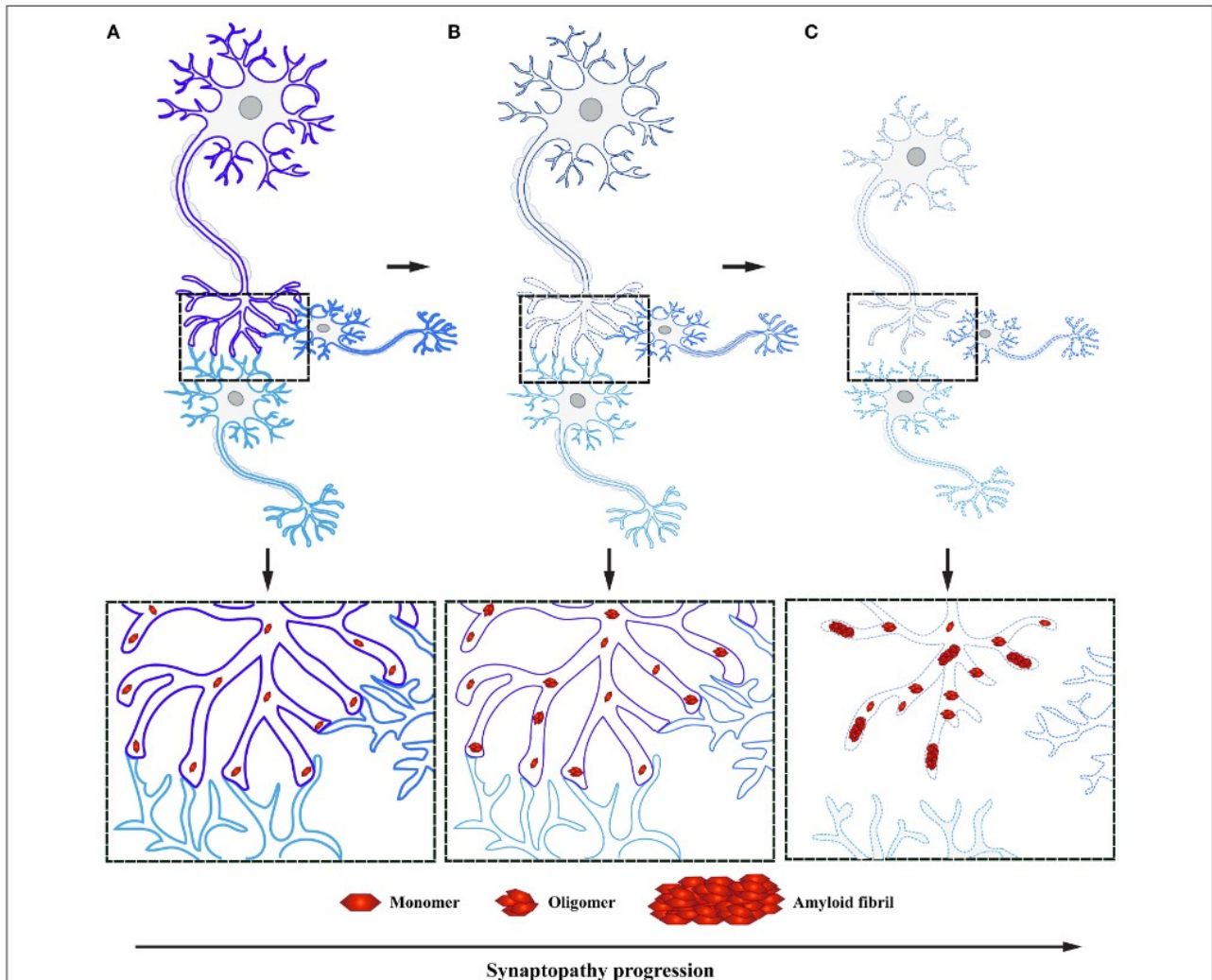


Figura 3 - Acúmulo de α -syn nos terminais pré-sinápticos e sinaptopatia. Adaptada de (Bridi & Hirth, 2018b). (A) Monômeros de α -syn nos terminais sinápticos em condição fisiológica. (B) Oligômeros e fibrilas desempenhando um papel fundamental na patogênese da DP. (C) Resultado do acúmulo tóxico de α -syn em regiões sinápticas, levando a perda de conexões neuronais e subsequente morte do pericário neuronal.

2.1.2.2 Disfunção mitocondrial associada à patologia da α -syn

A mitocôndria é uma organela envolvida na oxidação de metabólitos, geração de ATP, sinalização de Ca^{2+} e apoptose (BERNAL-CONDE et al., 2019). O acúmulo de α -syn em mitocôndrias foi identificado em achados patológicos de regiões como a substância negra e o estriado de pacientes com DP (Devi et al., 2008). Em situações de estresse oxidativo, como nas sinucleinopatias, a atividade mitocondrial é prejudicada, pois a proteína é capaz de alterar o metabolismo mitocondrial, resultando em uma diminuição da síntese de ATP e um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (NOS). Além disso, em meios ricos em α -syn, sua internalização pela mitocôndria parece se tornar um processo irreversível (MARTÍNEZ et al., 2018). Análise de tecidos cerebrais *post mortem* de pacientes com variadas sinucleinopatias demonstraram que agregados de α -syn patogênica têm maior afinidade pela mitocôndria do que a forma monomérica, indicando a disfunção mitocondrial como um mecanismo final (*downstream*) nesses distúrbios (WANG et al., 2019). Formas recessivas e dominantes da DP familiar possuem produtos gênicos alterados diretamente envolvidos com a atividade mitocondrial (SURMEIER, 2018). A disfunção mitocondrial tem sido investigada e proposta como um possível marcador biológico nas sinucleinopatias devido ao seu papel central nesses distúrbios e à sua interação com a α -syn patogênica (NAKAMURA, 2013; VILLAR-PIQUÉ; LOPES DA FONSECA; OUTEIRO, 2016).

A vulnerabilidade seletiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) na DP tem sido amplamente investigada e a disfunção mitocondrial parece desempenhar um papel relevante nesse processo (BOLAM; PISSADAKI, 2012). Esses neurônios possuem uma árvore axonal altamente densa e não mielinizada, com uma ordem de grandeza de ramificação muito maior do que outros subtipos neuronais (BRAAK et al., 2004; PISSADAKI; BOLAM, 2013). Os neurônios dopaminérgicos do estriado possuem uma árvore axonal pelo menos 10 vezes maior que outras classes de neurônios dopaminérgicos, colocando-os sob alta pressão por demanda energética e tornando-os mais susceptíveis a disfunções que interfiram na produção de energia (MATSUDA et al., 2009; PISSADAKI; BOLAM, 2013). Além disso, essa ampla árvore axonal está diretamente relacionada a uma maior quantidade de fendas sinápticas e, conseqüentemente, a um maior potencial de expressão de α -syn (ZHARIKOV et al., 2015). Outros fatores que podem contribuir para a morte seletiva dos neurônios dopaminérgicos são mutações genéticas e toxinas ambientais associadas a DP (como a rotenona), pois essas alteram funções

mitocondriais e, conseqüentemente, diminuem o aporte energético para essas células (SURMEIER, 2018).

2.1.2.3 Estresse Crônico de Retículo Endoplasmático associado à patologia da α -syn tóxica

O retículo endoplasmático (RE) desempenha um papel crucial na biossíntese de lipídeos e esteroides, armazenamento de Ca^{2+} intracelular e processamento proteico, incluindo modificações pós-traducionais, montagem e dobramento (BERNAL-CONDE et al., 2019; HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Cerca de um terço das proteínas celulares são processadas no RE antes de serem secretadas ou expressas na membrana celular (WALTER; RON, 2011). O estresse no RE pode ocorrer quando há desequilíbrio proteico, levando ao acúmulo de proteínas mal dobradas ou desdobradas em seu lúmen, sendo essa situação denominada estresse de RE (Grootjans et al., 2016). A homeostase proteica [proteostase], essencial para o funcionamento celular, também é mantida pela Resposta à Proteína Desdobrada (RPD), uma via de transdução de sinal capaz de responder a diversos tipos de estímulos, incluindo estresse no RE (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Durante o estresse de RE, a RPD ativa várias vias de sinalização e mecanismos regulatórios para corrigir o desequilíbrio proteico, incluindo a ativação de proteínas chaperonas, a redução de síntese proteica e o aumento da degradação proteica (HETZ; SAXENA, 2017). Em casos mais graves, quando há agregados ou proteínas mal dobradas no RE, a RPD pode ativar vias que levam à autofagia da própria organela (RON; WALTER, 2007).

Estudos com marcadores de estresse de RE em cérebros de pacientes com sinucleinopatias evidenciam o acúmulo de oligômeros de α -syn nessa organela (COLLA et al., 2012; HETZ; SAXENA, 2017; VILLAR-PIQUÉ; LOPES DA FONSECA; OUTEIRO, 2016). O estresse de RE crônico tem sido associado ao bloqueio na produção de proteínas sinápticas, implicando em alterações de memória e cognição, além da apoptose neuronal (HETZ; ZHANG; KAUFMAN, 2020). Alterações precoces na RPD ocorrem nas sinucleinopatias e aumentam progressivamente com a evolução do quadro clínico (COLLA et al., 2012). Mudanças no dobramento de proteínas podem atuar como gatilhos moleculares para o estresse de RE. Além disso, os agregados proteicos intra-RE podem levar à redução dos níveis de Ca^{2+} e ao mal funcionamento das chaperonas de RE dependentes de cálcio, à inibição do tráfego RE-Aparelho de Golgi e à inativação de receptores da via RPD (HETZ; SAXENA, 2017). Estudo sobre a chaperona de RE GRP78 (BiP), homóloga da HSP70 citoplasmática, demonstrou efeito neuroprotetor em um modelo genético para DP,

promovendo a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos da SN pela modulação da RPD (GORBATYUK et al., 2012).

A neuroinflamação também desempenha um papel relevante no estresse crônico de RE. A ativação prolongada do sistema imunológico e produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias podem levar ao estresse de RE, causando alterações na regulação do dobramento de proteínas e no transporte associado a essa organela (CLAYTON; POPKO, 2016; WAY; POPKO, 2016).

2.1.2.4 Estresse do Aparelho de Golgi associado à patologia da α -syn

O Aparelho de Golgi (AG) é constituído por um conjunto de estruturas de membrana cisternais achatadas e desempenha duas funções principais: realizar modificações pós-traducionais de proteínas e organizar (triagem, empacotamento, encaminhamento e reciclagem) moléculas para seus destinos celulares (LIU et al., 2021; RIOS; BORNENS, 2003). Uma característica comum nas doenças neurodegenerativas é a fragmentação da fita do AG, resultando em alterações no tráfego e na produção de proteínas (LIU et al., 2021; RENDÓN et al., 2013; WEI et al., 2023). Embora o AG permaneça funcional quando fragmentado, sua morfologia em fita não fragmentada é crucial para o estabelecimento e a manutenção da polaridade celular (organização e distribuição de componentes celulares dentro da célula), resposta ao estresse, regulação inibitória da autofagia e outras funções (MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ et al., 2019).

Alterações no AG são observadas precocemente na cascata patológica dos distúrbios neurodegenerativos, podendo modificar a fisiologia neuronal e induzir falhas na transmissão sináptica (MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ et al., 2019). Além disso, sensores de estresse específicos do AG são capazes de conduzir a célula a vias de morte celular (RIOS; BORNENS, 2003). No contexto das sinucleinopatias, o dano ao AG pode desencadear agregação da α -syn, que, por sua vez, inibe o transporte associado ao AG e leva ao acúmulo de substâncias tóxicas, causando estresse oxidativo e apoptose celular (WEI et al., 2023). Mutações nos genes *LRRK2* e *PARK8*, as causas mais comuns de DP familiar, estão associadas a alterações na integridade do AG, no tráfego de vesículas e nas funções lisossomais (ERB; MOORE, 2020; LIU et al., 2021). Outras genes associados a DP, como os *SNCA*, *Parkin* e *VPS35*, também afetam o AG (ERB; MOORE, 2020). Um conjunto de evidências tem apontado que a interrupção do transporte RE-AG é um passo fundamental na fisiopatologia da DP (PRANKE et al., 2011). O estresse do AG causa modificações

no RE, como o aumento da concentração da Chaperona HSP47 no RE, uma forma de prevenir apoptose induzida por estresse do AG (SASAKI; YOSHIDA, 2015).

Em resumo, nas sinucleinopatias, o acúmulo de α -syn parece interferir nas funções de transporte e processamento do AG, levando a disfunções no endereçamento de componentes celulares, no funcionamento de outras organelas e, conseqüentemente, na sobrevivência neuronal, interferindo na progressão da doença. Como as alterações do AG parecem acontecer precocemente nos distúrbios neurodegenerativos, compreender seus mecanismos pode fornecer *insights* para o desenvolvimento de novas terapias e marcadores.

2.1.2.5 Alterações de depuração celular associadas à patologia da α -syn

A eliminação da α -syn depende, em grande parte, das vias celulares de depuração endossoma-lisossoma [via de autofagia-endolisossomal] e do sistema ubiquitina-proteassoma (WANG; HAY, 2015).

A via de autofagia-endolisossomal (VAL) é responsável pela remoção de proteínas, solúveis e agregadas, e organelas danificadas que são conduzidas para autofagossomos que, posteriormente, se fundem a lisossomos onde terão seus conteúdos degradados por enzimas catalíticas (MORTIMORE et al., 1996). Os lisossomos são organelas vitais e o principal componente de degradação celular (SMITH; MELLICK; SYKES, 2023). Defeitos na função lisossomal podem culminar em alterações que levam ao acúmulo e armazenamento de proteínas, características de doenças neurodegenerativas crônicas como a DP (FERREIRA; GAHL, 2017). A VAL é um processo celular central na vitalidade celular e seu comprometimento conduz à neurodegeneração (TANIK et al., 2013). Em algumas sinucleinopatias, como na DP e na DCL, observa-se que o acúmulo predominante de fibrilas de α -syn axonal [Neuritos de Lewy] prejudica o transporte de endossomos e autofagossomos, interferindo na sinalização e na função dessa via de degradação (VOLPICELLI-DALEY et al., 2014).

A ubiquitinação é um sinal de direcionamento proteolítico para ambos sistemas de depuração (WATANABE; TAGUCHI; TANAKA, 2020). No sistema proteossomal, os substratos a serem degradados possuem um limite de tamanho e são dependentes da ubiquitinação. Ao ser marcado pela ubiquitina, o substrato é reconhecido pelo sistema proteossomal, para então ser desubiquitinado, desdoblado, internalizado e degradado pelo proteassoma (POHL; DIKIC, 2019). Proteínas mal dobradas e que não puderam ser corrigidas por chaperonas são ubiquitinadas e

degradadas para prevenir o ganho de função tóxica, levando à morte celular (GALVES et al., 2019). O sistema proteossomal tem um papel central na manutenção da proteostase neuronal, pois é capaz de manter o funcionamento fisiológico das sinapses, renovar proteínas sinápticas e favorecer a plasticidade e formação de memórias de longo prazo, sendo a perda de sua função associada a uma variedade de doenças neurodegenerativas crônicas (CIECHANOVER; BRUNDIN, 2003; RUBINSZTEIN, 2006; THIBAudeau; ANDERSON; SMITH, 2018). Alguns estudos já evidenciaram que vários agregados proteicos nos distúrbios neurodegenerativos interagem e prejudicam o sistema proteossomal (CECARINI et al., 2008; DÍAZ-HERNÁNDEZ et al., 2006; EMMANOUILIDOU; STEFANIS; VEKRELLIS, 2010; LINDERSSON et al., 2004; TSENG et al., 2008). Logo, compreender os mecanismos associados aos danos às vias de depuração pode contribuir para o desenvolvimento de novas drogas que restaurem suas atividades e a proteostase cerebral (Figura 4).

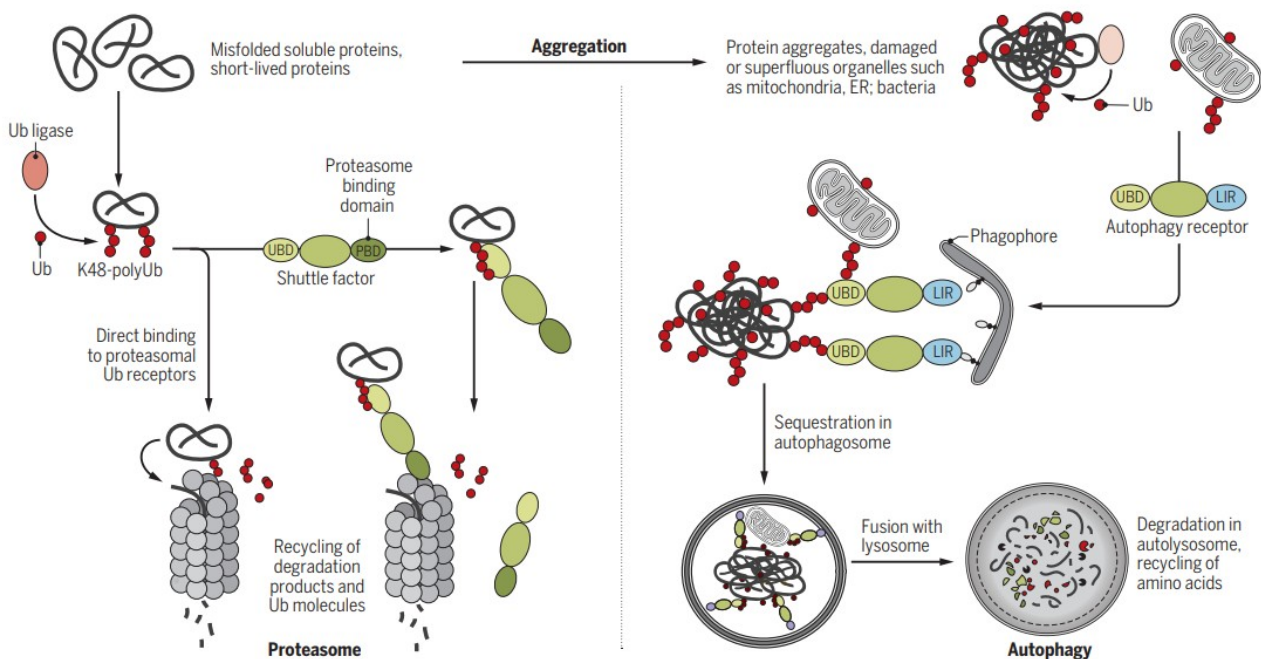


Figura 4 - Diferenças entre os sistemas de depuração Proteossomal e de Autofagia. Adaptado de (Pohl & Dikic, 2019). No sistema proteossomal, a esquerda, os substratos a serem degradados possuem um limite de tamanho e são dependentes da ubiquitinização. Ao ser marcado pela ubiquitina esse substrato, normalmente uma proteína, é reconhecido pelo sistema proteossomal e então é: desubiquitinado, desdobrado, internalizado e degradado pelo proteassoma. A via de autofagia-endolisossomal, a direita, é responsável pela remoção de proteínas, solúveis e agregadas, e organelas danificadas que são conduzidas para autofagossomos que, posteriormente, se fundem a lisossomos onde terão seus conteúdos degradados por enzimas catalíticas.

2.2 DOENÇA DE PARKINSON

A Doença de Parkinson é caracterizada fisiopatologicamente pela perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc e pela presença de CL, mas devido à sua etiologia complexa, ainda não se sabe quais mecanismos levam à morte desses neurônios (SAVICA; BOEVE; MIELKE, 2018; ZHANG; GAO, 2022). Por muito tempo foi considerada um distúrbio do movimento caracterizado pela tétade de déficits motores: bradicinesia, tremor de repouso, instabilidade postural e rigidez (TANSEY et al., 2022). Atualmente, a DP é descrita como uma doença neurodegenerativa multissistêmica que acomete concomitantemente o SNC, o sistema nervoso entérico (SNE), o sistema nervoso autônomo (SNA) e o sistema imune, apresentando pronunciada neuroinflamação, disfunção imunológica central e sistêmica e, clinicamente, caracterizada pela presença de sintomas motores (SM) e não motores (SNM) (COSTA et al., 2023; JOHNSON et al., 2019; TANSEY et al., 2022; YE et al., 2023).

No dia 11 de abril, se celebra o Dia Mundial da Conscientização da Doença de Parkinson. Nessa data, em 1817, o médico inglês James Parkinson publicou um estudo pioneiro caracterizando pacientes com a doença, intitulada por ele como “Paralisia Agitante” (OBESO et al., 2017). Em 11 de abril de 2022, dois séculos após sua caracterização, o objetivo principal dessa efeméride foi a conscientização sobre a doença, incentivando ações em prol de impactar o futuro da enfermidade, por meio da pesquisa, do cuidado e do planejamento de vida (ALVES, [s.d.]

Logo após sua caracterização, a DP foi considerada uma doença rara; no entanto, em um curto espaço de tempo, tornou-se comum e, atualmente, tem demandando um amplo planejamento dos governos por meio de novas abordagens devido ao franco aumento do número de casos, seu grande impacto na vida dos pacientes e familiares, elevado potencial incapacitante e altos custos associados (DORSEY et al., 2018b). Além disso, o sexo biológico é um fator relevante no desenvolvimento da DP, com o sexo masculino apresentando um risco duas vezes maior de desenvolver a doença, enquanto o sexo feminino apresenta quadros de progressão mais rápida e maior taxa de mortalidade (CERRI; MUS; BLANDINI, 2019). Estudos vêm demonstrando que, à medida que a doença de Parkinson progride, os custos associados também aumentam consideravelmente. O acompanhamento longitudinal de um grupo de pacientes com DP mostrou um aumento de 92,5% dos custos associados ao tratamento entre o primeiro e o quarto anos do estudo (MARTINEZ-MARTÍN et al., 2015; SILVA et al., 2021). Outro trabalho, realizado em países europeus, apontou um gasto econômico associado à doença de €2.620 a €9.820 por paciente em um período de 6 meses, sendo a internação, cuidados prolongados e medicamentos as principais fontes

desses gastos (VON CAMPENHAUSEN et al., 2011). No Brasil, há uma carência de estudos demonstrando os custos associados à DP, com predominância de análises focadas nos aspectos clínicos da doença (BOVOLENTA et al., 2017; VARGAS et al., 2008).

Atualmente, as desordens neurológicas são a principal causa de incapacidades no mundo, e a DP é a que mais cresceu entre elas, apresentando um aumento de casos de 118% entre 1990 e 2015, segundo o Estudo Global de Carga de Doenças, Lesões e Fatores de Risco (DORSEY et al., 2018a). Impulsionada pelo envelhecimento populacional, aumento da longevidade, industrialização e diminuição do tabagismo, o número de pessoas com DP pode chegar a mais de 12 milhões em 2040 (FEIGIN et al., 2017). Atualmente, é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo [sendo a primeira a Doença de Alzheimer], apresentando taxa de incidência, em países desenvolvidos, de 14 a cada 100.000 pessoas, na população geral, de 160 a cada 100.000 pessoas, na população acima de 65 anos, e taxas de prevalência que aumentaram em quase 22% em todo o mundo, podendo ser o distúrbio neurológico de crescimento mais rápido no mundo atualmente (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; DORSEY et al., 2018b; HIRTZ et al., 2007). No Brasil, a notificação da DP não é compulsória, tornando os dados estimados (ALVES, [s.d.]). Em 2016, estimou-se uma prevalência de DP na população brasileira de 220 mil casos (BOVOLENTA; FELÍCIO, 2016). Aplicando a mesma taxa de prevalência de 3,3%, encontrada em um estudo realizado no município de Bambuí (MG) na população acima de 60 anos brasileira, segundo dados do IBGE, teríamos aproximadamente 1 milhão de pessoas com DP no Brasil em 2021 (BARBOSA et al., 2006; IBGE, 2022).

2.2.1 Etiologia

Descobrir a etiologia da DP tem sido um desafio, mas há um consenso entre os estudiosos da área de que a maioria dos casos de DP se deve a um continuum de interação entre a predisposição genética, fatores ambientais favoráveis e o envelhecimento [DP esporádica], enquanto as formas associadas a mutações genéticas em um único gene [DP monogênica] representam apenas de 3-5% dos casos (BLOEM et al., 2021; COSTA et al., 2023; NANDIPATI & LITVAN, 2016). Apesar de raras, as formas monogênicas são fundamentais no estudo e na compreensão da fisiopatologia da doença, revelando, por exemplo, que alterações na expressão de α -syn (*SNCA*), bem como nos processos de autofagia (*PARK1*), na codificação de enzimas lisossomais e em alterações mitocondriais (*LRRK2*, *DJI*, *PINK1* e *Parkin*) podem desencadear a doença (Ye et al., 2023).

Uma correlação positiva entre o PIB (produto interno bruto) e a prevalência de Parkinson também foi identificada indicando que atividades relacionadas à industrialização podem estar favorecendo um aumento da prevalência da doença (DORSEY et al., 2018a). Uma das possíveis explicações para essa correlação aponta para a presença de subprodutos da industrialização (agentes agressores), como pesticidas, solventes e metais pesados no ambiente (FEIGIN et al., 2017; GOLDMAN, 2014).

A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos relacionados às mutações monogênicas e o avanço das técnicas de decodificação do genoma humano evoluíram bastante nos últimos anos. Apesar disso, o entendimento dos fatores ambientais (tanto os predisponentes quanto os protetores) e como eles modulam os organismos epigeneticamente e afetam a saúde dos indivíduos ainda é um grande desafio a ser desvendado (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021).

2.2.2 Fisiopatologia

A fisiopatologia da DP resulta de uma complexa interação entre as formas aberrantes de α -syn, disfunção mitocondrial, lisossomal, sinaptopatia, estresse de algumas organelas e neuroinflamação, levando ao acúmulo de α -syn em Corpos de Lewy e Neuritos de Lewy, marcadores patológicos da doença (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021). Os neurônios dopaminérgicos da SNpc demonstram ser particularmente sensíveis à patologia de Lewy, o que se traduz na depleção de dopamina estriatal e culmina em bradicinesia e rigidez corporal. No entanto, a morte neuronal ocorre também em várias outras regiões cerebrais levando a mais alterações clínicas (KALIA; LANG, 2015). Com exceção de alguns casos genéticos específicos, o diagnóstico definitivo só pode ser estabelecido após análise histopatológica *post mortem* com a identificação dos marcadores histopatológicos (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021). No entanto, na prática clínica, o diagnóstico é realizado por meio de anamnese e exame neurológico, sendo esse diagnóstico suportado por uma boa resposta ao tratamento [levodopa] (POSTUMA et al., 2015).

2.2.2.1 Quadro Clínico

A DP não se comporta como uma alteração única para todos os indivíduos, existindo um amplo espectro de progressão entre os pacientes, o que torna o entendimento por completo da sua fisiopatologia um desafio (ARMSTRONG; OKUN, 2020). Além disso, diferentes causas podem levar a uma síndrome clínica semelhante [Parkinsonismo], mas o contrário também é observado, em que um mesmo fator, como a exposição ao MPTP ou uma mesma mutação gênica, podem causar padrões de progressão da doença altamente variáveis entre indivíduos (BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021).

Devido aos variados fenótipos clínicos, o reconhecimento do estágio inicial da doença se torna um desafio para profissionais e pacientes. Apesar dos sintomas motores serem mais facilmente reconhecidos, os sintomas não motores são altamente prevalentes e estão associados a outros sistemas de neurotransmissão além do dopaminérgico, como o noradrenérgico, serotoninérgico e colinérgico (ARMSTRONG; OKUN, 2020; BLOEM; OKUN; KLEIN, 2021; GAENSLIN et al., 2011).

Alterações gastrointestinais como sialorreia, disfagia e constipação acometem cerca de 90% dos pacientes (FASANO et al., 2017). Disfunções cardiovasculares como hipotensão ortostática e hipertensão lábil acometem de 30-40% dos indivíduos com DP (VELSEBOER et al., 2011). Já o sintoma de hiposmia e anosmia [perda do olfato] acomete 90% dos casos e alterações sensoriais associadas à visão e a dor também apresentam uma frequência bastante elevada (BOHNEN et al., 2010).

Distúrbios comportamentais como alterações do sono REM, insônia, acatisia e síndrome das pernas inquietas podem afetar até 70% dos indivíduos (MENZA et al., 2010). A presença de distúrbios neuropsiquiátricos como ansiedade, acometem 60% dos casos e têm predominância no sexo feminino (LIN et al., 2015). Disfunções cognitivas afetam 83% dos casos, sendo que indivíduos com DP apresentam um risco seis vezes maior de demência quando comparados à população geral (AARSLAND et al., 2021; HELY et al., 2008).

Diante da ampla variedade de apresentações e sintomatologias, o estabelecimento de subtipos de DP tem ajudado a determinar o local de início da patologia [se intestinal ou cerebral], o prognóstico [uma forma mais difusa e com pior prognóstico foi identificada em 2019] e o

desenvolvimento de tratamentos mais personalizados para o futuro (DE PABLO-FERNÁNDEZ et al., 2019).

Em 2003, o casal de neuroanatomistas Heiko Braak e Eva Braak publicou um estudo hipotetizando, pela primeira vez, que a DP esporádica se desenvolve de maneira sequenciada, afetando de maneira predeterminada e crescente as regiões encefálicas envolvidas e, à medida que a doença progride, essas lesões vão se agravando, sendo possível fazer um estadiamento neuropatológico baseado na disseminação dos marcadores [NL e CL] na topografia dessas regiões [conforme exemplificado na Figura 5] (BRAAK et al., 2003). Para investigar essa hipótese, os pesquisadores avaliaram 3 grandes grupos de cérebros obtidos em autópsias. O primeiro grupo foi de indivíduos com diagnóstico clínico de DP, o segundo grupo continha pacientes que apresentavam NL e CL em regiões extranigrais associadas a DP e o terceiro grupo foi composto por indivíduos com faixa etária entre $75,9 \pm 8,2$ anos e gênero pareados aos outros dois grupos e que não apresentavam NL e CL nos núcleos motores dorsal do nervo vago e do nervo glossofaríngeo. A gravidade da DP foi correlacionada ao grau de estadiamento da doença, bem como à quantidade de inclusões citoplasmáticas [CL e NL] e à neurodegeneração encontrada (BRAAK et al., 2003). Alguns estudos corroborando com a hipótese dos Braak conseguiram demonstrar, em pesquisas com animais, que a α -syn patogênica pode se formar nos terminais nervosos entéricos e se espalhar, via conexões autonômicas, para o núcleo motor dorsal do nervo vago (KIM et al., 2019; STOKHOLM et al., 2016; VAN DEN BERGE et al., 2019). Além disso, evidências epidemiológicas indicam que pessoas vagotomizadas possuem risco diminuído de desenvolver DP (B et al., 2017; SVENSSON et al., 2015). No entanto, existem casos de DP que não apresentam inclusões de Lewy no núcleo dorsal do nervo vago e outros casos com um grande número de inclusões no sistema límbico, porém poucas inclusões no tronco cerebral, reforçando a ideia de subtipos da doença (PARKKINEN; PIRTTILÄ; ALAFUZOFF, 2008; RAUNIO et al., 2019). Com base nessas observações, alguns estudiosos propuseram uma subclassificação para a doença: ascendente (se iniciando no SNE ou SN periférico e subindo para o SNC) e o subtipo descendente (iniciando-se no cérebro ou bulbo olfatório e descendo pelo SN periférico e SNE), como pode ser observado na figura a seguir (Figura 6) (HORSAGER et al., 2020).

Progression of PD-related intraneuronal pathology

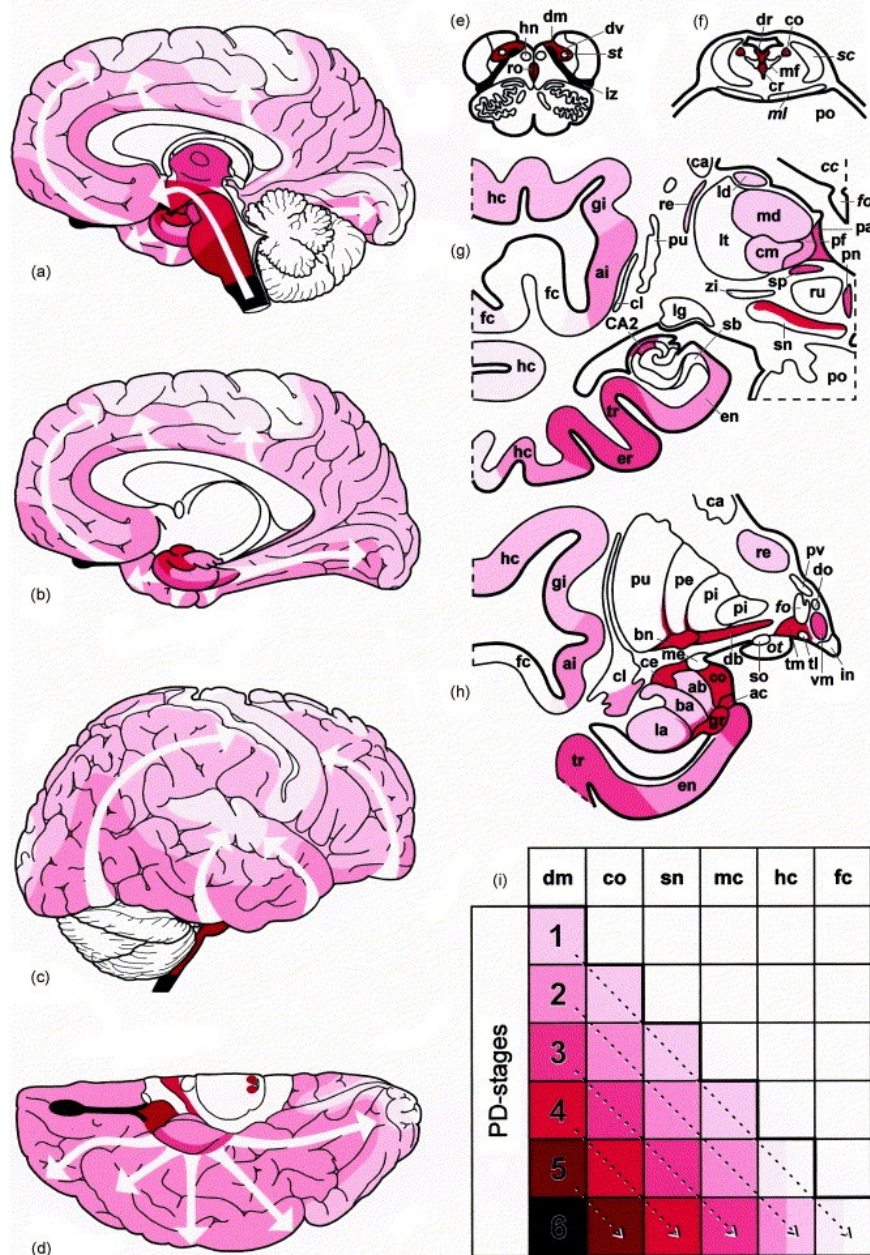


Figura 5 - Estadiamento, proposto por Braak, da Doença de Parkinson. Adaptado de (Braak et al., 2003). As lesões ocorrem inicialmente no núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeo e vago dorsal (a) e frequentemente também no núcleo olfatório anterior (d). A partir daí, estruturas cerebrais menos suscetíveis tornam-se gradativamente envolvidas (setas brancas). A patologia no núcleo olfatório anterior se expande menos prontamente do que a que evolui do tronco encefálico. Diagrama simplificado (i) mostrando a expansão topográfica das lesões (de dm para fc) e, simultaneamente, a gravidade crescente por parte da patologia geral (estágios 1–6). Abreviaturas (i): dm, núcleo motor dorsal dos nervos glossofaríngeo e vago; co, complexo coeruleus-subcoeruleus; sn, substância negra; mc, mesocórtex temporal anteromedial; hc, áreas de associação sensorial de alta ordem e campos pré-frontais; fc, áreas de associação sensorial de primeira ordem, áreas pré-motoras, bem como campos motores e sensoriais primários; gi, córtex insular granular; gr, núcleo granular da amígdala.

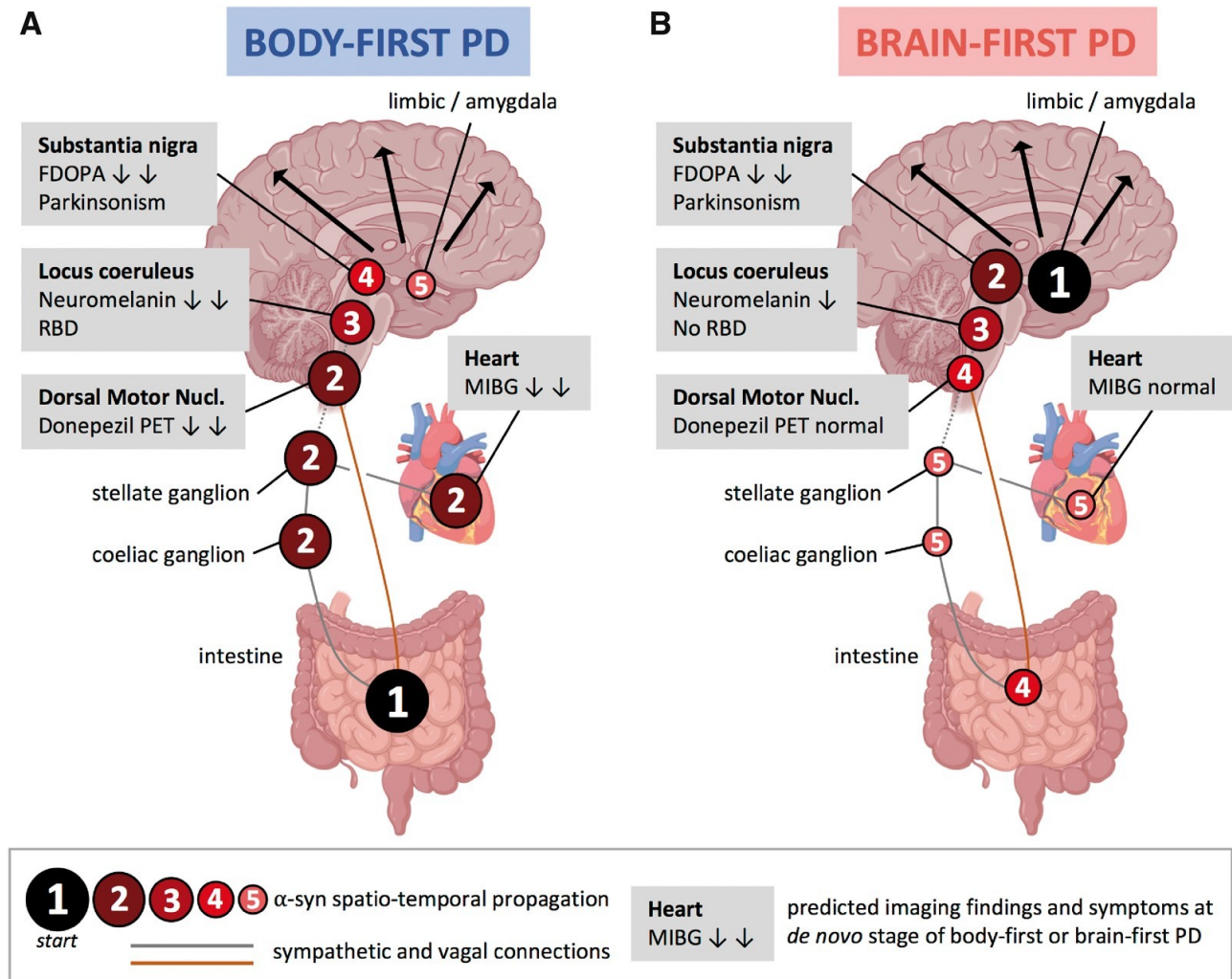


Figura 6 - Subtipos de Doença de Parkinson: uma hipótese. Adaptado de (Horsager et al., 2020a). (A) Subtipo Corpo primeiro: a disseminação da α -syn patológica iniciando no sistema nervoso autônomo entérico ou periférico ascendendo até o SNC. (B) Subtipo Cérebro primeiro: a disseminação da α -syn patológica se inicia no SNC e vai progredindo até acometer o sistema nervoso autônomo entérico ou periférico.

2.2.2.2 Alterações de Memória Hipocampal

Como pode ser observado no tópico anterior, as disfunções associadas ao Parkinson impactam significativamente a qualidade de vida, repercutindo em funções ocupacionais, sociais e nas atividades de vida diária dos pacientes e de seus cuidadores (KAY; UC, 2022). As disfunções cognitivas são altamente prevalentes e são subdivididas em quatro domínios cognitivos que

apresentam grande variação interindividual, sendo eles: habilidade executiva, atencional, visuoespacial e de memória (DAS; HWANG; POSTON, 2019). As disfunções de memória acontecem em diversos distúrbios neurológicos que afetam a função cerebral, como no estado epilético, no acidente vascular cerebral e nos distúrbios neurodegenerativos (MATTHEWS, 2015). Em indivíduos com DP, a alteração de memória é o domínio mais frequentemente afetado em pessoas recém-diagnosticadas (AARSLAND et al., 2021; MUSLIMOVIĆ et al., 2005).

A memória pode ser tipificada em quatro sistemas: memória semântica, de trabalho, processual e episódica (MATTHEWS, 2015). A memória semântica está relacionada aos aprendizados do indivíduo com relação às coisas do mundo, desde seus conceitos até suas funcionalidades (ROGERS et al., 2004). Neuroanatomicamente, está associada às regiões anterior e inferolateral do lobo temporal (GORNO-TEMPINI et al., 2011). Já a memória de trabalho, associada à capacidade do indivíduo de processar ativamente e rapidamente informações verbais e não-verbais para completar tarefas e objetivos focados, está neuroanatomicamente mais associada ao córtex pré-frontal (MATTHEWS, 2015). A memória processual se refere à capacidade do indivíduo em adquirir de maneira prática (não declarativa) habilidades cognitivas e comportamentais que, posteriormente, se automatizam, como, por exemplo, andar de bicicleta, e envolve principalmente os gânglios da base, o cerebelo e a área motora suplementar do córtex (BUDSON; PRICE, 2005; MATTHEWS, 2015). Por fim, a memória episódica está associada à capacidade que um indivíduo possui de se recordar conscientemente de episódios e experiências que passou e está ligada ao senso de individualidade e tempo (TULVING, 2001). Neuroanatomicamente, seu funcionamento envolve fortemente a via trissináptica (DG-CA3-CA1) hipocampal (MATTHEWS, 2015).

Apesar dos sistemas de memória serem dissociáveis, eles são altamente inter-relacionados e, frequentemente, estão alterados conjuntamente nos distúrbios neurodegenerativos, como na doença de Alzheimer e na DP (MATTHEWS, 2015). Também é comum que esses pacientes passem por um espectro de alterações cognitivas que vão evoluindo com o tempo de diagnóstico, saindo de um estado normal para um declínio subjetivo (difícilmente diagnosticado), depois para um comprometimento cognitivo leve e, por vezes, alcançando um diagnóstico de demência, que também pode ser leve, moderada ou grave (AARSLAND et al., 2021). Um estudo de caso-controle, realizado em 2012, mostrou que, por análises de imagens obtidas por ressonância magnética (RM), o comprometimento da memória declarativa [de longa duração] de 62 pacientes com DP pôde ser previsto por alterações microestruturais hipocampais (CARLESIMO et al., 2012). Essas alterações microestruturais hipocampais medidas por RM também foram encontradas em outro estudo que

demonstrou que a espessura do subcampo CA1 hipocampal pode ser uma medida sensível na identificação de alterações de memória episódica nesses indivíduos (LA et al., 2019).

O padrão e o momento em que ocorre o declínio cognitivo variam amplamente entre os indivíduos. Identificar marcadores biológicos para o declínio cognitivo permitirá prever quais pacientes possuem um risco aumentado de declínio cognitivo precoce e de evolução rápida, sendo um importante marcador prognóstico e possibilitando intervenções mais precoces (SVENNINGSSON et al., 2012). É importante ressaltar que as alterações cognitivas na DP refletem mudanças neuroquímicas em diversos sistemas (dopaminérgicos, colinérgicos, noradrenérgicos e serotoninérgicos), bem como mudanças patológicas devido à presença de CL, disfunção e perda sináptica, coexistência com a Doença de Alzheimer, neuroinflamação entre outros mecanismos (GOLDMAN; SIEG, 2020).

2.3 NEUROINFLAMAÇÃO

A neuroinflamação é uma característica marcante nos pacientes com DP e possui um papel central na patogênese da neurodegeneração (LIU; CHEN; CHANG, 2022). Foi demonstrado que o soro e o líquido cefalorraquidiano de pacientes com DP apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, TNF, IL-1 β e IFN γ , e que o parênquima cerebral, principalmente a base do mesencéfalo, apresenta intensa ativação microglial e aumento da expressão do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), locus gênico responsável pela codificação de proteínas de superfície que reconhecem e apresentam antígenos próprios ou externos ao sistema imune (LIU; CHEN; CHANG, 2022, 2022; SLITER et al., 2018; ZHU et al., 2022). Aproximadamente 40% dos indivíduos com DP exibem resposta imune a epítomos de α -syn e mutações monogênicas como *PINK1* e *PARKIN*, relacionadas à DP de início precoce, estão associadas à neuroinflamação e à neurodegeneração na doença (SLITER et al., 2018; SULZER et al., 2017). Receptores imunes inatos do tipo Toll (TLRs) no SNC estão localizados principalmente na micróglia e são peças fundamentais no desencadeamento de respostas inflamatórias (HEIDARI; YAZDANPANA; REZAEI, 2022). As áreas de degeneração da DP são marcadas pelo perfil mais responsivo de micróglia e astrócitos, células glia envolvidas também na depuração de detritos (Kalia & Lang, 2015). A micróglia é capaz de liberar fatores tróficos como BDNF e o GDNF, que protegem os neurônios dopaminérgicos, mas também espécies reativas de oxigênio (NOS) e citocinas pró-inflamatórias, capazes de lesá-los (NAPOLI; NEUMANN, 2009; PHANI; LOIKE;

PRZEDBORSKI, 2012). As causas, consequências e os momentos específicos de liberação dessas substâncias pela micróglia continuam a ser um constante objeto de estudo. Já está demonstrado que a α -syn patogênica atua como um gatilho para a ativação de micróglia e astrócitos, favorecendo respostas pró-inflamatórias e neurodegeneração (KAM et al., 2020).

2.4 INFLAMASSOMA

O inflamassoma é um complexo proteico citosólico que responde à presença de Padrões Moleculares associados a Patógenos e a Danos (PAMPs e DAMPs), levando a produção de citocinas pró-inflamatórias [IL-1 β e IL-18] e podendo desencadear morte celular por piroptose (SWANSON; DENG; TING, 2019). Constituído por 3 componentes: um receptor de reconhecimento de padrões moleculares (NLRP), uma proteína adaptadora contendo um domínio para recrutamento de caspases (ASC) e uma molécula efetora, a Caspase-1, uma protease envolvida na cascata de apoptose e inflamação (LI et al., 2021). Expresso no citosol em um estado auto-inibido, no SNC o inflamassoma está predominantemente localizado nas micróglia e sua hiperativação está associada a várias condições autoimunes, doenças inflamatórias crônicas, metabólicas e neurodegenerativas (HENEKA; MCMANUS; LATZ, 2018; JO et al., 2016).

A família dos inflamassomas foi extensivamente investigada no contexto da ativação microglial e da neurodegeneração progressiva de neurônios dopaminérgicos na DP, com níveis elevados de IL-18, IL-1 β e Caspase-1 observados no soro e no estriado de cérebros post mortem de pacientes com DP (AHMED et al., 2021). O receptor do inflamassoma NLRP3 é o mais estudado no SNC, atuando como um sensor do sistema imunológico inato, detectando tanto PAMPs, como lipopolissacarídeos, quanto DAMPs, como a α -syn patológica na DP (FU; WU, 2023). A via canônica de ativação do NLRP3 é regulada por mecanismos transcricionais e pós-traducionais, requerendo dois estímulos para sua completa ativação (JO et al., 2016). O primeiro estímulo é desencadeado pela ativação de receptores do tipo Toll (TLR) ou receptores de citocinas, culminando com a ativação do fator de transcrição NF- κ B, resultando na transcrição de pro-IL1 β , pro-IL18, do receptor NLRP3 e de outros mediadores inflamatórios (HENEKA; MCMANUS; LATZ, 2018; SWANSON; DENG; TING, 2019). O segundo estímulo leva à montagem do inflamassoma, no qual a presença da Caspase-1 acarretará na clivagem das formas imaturas pro-IL1 β e pro-IL18 em formas maduras, além de outras alterações intracelulares, como influxos e efluxos iônicos, como o do íon K⁺, podendo levar à piroptose (JO et al., 2016; NENNIG; SCHANK, 2017; NGUYEN et al.,

2022; SHARMA; KANNEGANTI, 2021). Um estado mais reativo da micróglia, como observado na hiperativação do NLRP3, tem sido associado à redução do processo de autofagia celular, contribuindo para a agregação de α -syn e progressão de doenças neurodegenerativas (LI et al., 2021).

Na doença de Parkinson, a α -syn mal dobrada pode funcionar como gatilho para ambas as etapas dessa via (HAQUE et al., 2020). Foi descrita uma correlação linear entre os níveis de α -syn fosforilada e aumento nos níveis de IL-1 β e NLRP3 no líquido de pacientes com DP (CHATTERJEE et al., 2020). Além disso, estudos demonstraram que a administração de inibidores de inflamassoma em modelos murinos de DP reduz significativamente os déficits motores, a neurodegeneração dopaminérgica nigral, a depleção de dopamina estriatal e o acúmulo de α -syn (GORDON et al., 2018; OU et al., 2021). No entanto, inibidores de inflamassoma podem causar a ativação de outros sistemas, resultando em efeitos colaterais, maior toxicidade e a necessidade de doses elevadas para alcançar os efeitos desejados em modelos da doença, como o MCC950, que foi utilizado em estudo clínico com pacientes com artrite reumatóide, mas precisou ser descontinuado por seus efeitos colaterais hepatotóxicos (BAKHSI; SHAMSI, 2022; LI et al., 2021; NGUYEN et al., 2022; OU et al., 2021). Ainda assim, a investigação dos mecanismos associados à ativação do NLRP3 microglial na DP é relevante, pois esta via pode estar envolvida na manutenção da neuroinflamação na doença e representar um alvo terapêutico promissor.

2.5 VIA DAS CHAPERONAS

Dentre as variadas funções que ainda estão sendo descobertas, há um consenso de que chaperonas e co-chaperonas são um conjunto de proteínas citoplasmáticas que desempenham um papel central na manutenção da proteostase celular. Elas participam da regulação de complexos macromoleculares, em interações proteína-proteína, no dobramento e na maturação de proteínas clientes, fazem a identificação de estados conformacionais alterados, auxiliando no reenovelamento e, em casos de defeitos conformacionais mais graves, direcionam tais proteínas para vias de degradação (LACKIE et al., 2017). As chaperonas, muitas delas também conhecidas como Proteínas de Choque Térmico (HSP), desempenham um importante papel na linha de defesa contra o ganho de função patológica associada ao mau enovelamento de proteínas, integrando um sistema de controle de qualidade celular (BARTKOWIAK; PANTEL, 2016).

A HSP90 corresponde a aproximadamente 1% de todas as proteínas celulares em organismos eucariotos (BORKOVICH et al., 1989). Normalmente, proteínas clientes são captadas por chaperonas como a HSP40 e a HSP70 antes de serem transferidas para a HSP90, via co-chaperonas, como a STI1 (LACKIE et al., 2017). Estudos têm sugerido um papel relevante da HSP90 na neurodegeneração e inibidores farmacológicos dessa molécula têm sido utilizados para investigar esse papel. A inibição da HSP90 regula positivamente chaperonas como a HSP70 e HSP40, melhorando o quadro sintomatológico de distúrbios neurodegenerativos em modelos animais, como doença de Alzheimer, DP, Doença de Huntington e atrofia muscular espinhal e bulbar (PRATT et al., 2015; RUTLEDGE; CHOY; DUENNWALD, 2022). Além disso, parece que a HSP90 e a HSP70 se comportam de maneira oposta sobre as proteínas clientes. Enquanto a HSP90 estabiliza e inibe a ubiquitinação de proteínas (revelando uma atuação estabilizadora), a HSP70 promove a ubiquitinação e degradação proteossomal, tendo um papel mais protetor (PRATT et al., 2015; RUTLEDGE; CHOY; DUENNWALD, 2022).

Além do estudo molecular individual e dos complexos macromoleculares, outro aspecto das chaperonas tem ganhado destaque: o interactoma, que diz respeito a como as moléculas dessa via estão interconectadas e interagem entre si em situações fisiológicas [chaperoma] e patológicas [epichaperoma]. Em 2016, Rodina e colegas, estudando o interactoma das chaperonas no câncer, identificaram que essa rede apresentava-se alterada em relação à sua função e morfologia em mais de mais de 50% dos tecidos tumorais humanos investigados, e a nomearam como epichaperoma. Segundo eles, o epichaperoma dos tecidos tumorais foi capaz de aumentar a sobrevivência das células tumorais, independente do tipo de tumor e do contexto genético do hospedeiro (RODINA et al., 2016). Nos tecidos tumorais, a HSP90, a chaperona mais abundante nas células humanas, apresentava mais de um ponto isoelétrico, indicando a presença de mais de uma isoforma ativa da proteína. Além disso, ela, juntamente com a HSP70, também interagem com várias outras chaperonas e co-chaperonas, tendo um papel central nesse complexo multimérico de chaperonas (RODINA et al., 2016). A partir desse estudo, *insights* sobre um estado alterado das conexões entre essas proteínas nas patologias começaram a surgir, indicando que tais alterações podem estar favorecendo o estabelecimento de hetero-oligômeros e o surgimento de novos complexos de alto peso molecular, que podem estar favorecendo o estabelecimento de patologias e contribuindo para suas progressões (RODINA et al., 2016).

Além das pesquisas na área do câncer, o complexo do epichaperoma vem sendo investigado no contexto de outras patologias, incluindo as neurodegenerativas (KISHINEVSKY et al., 2018). Na DP, uma hipótese levantada sugere que a HSP90 pode estar com sua função alterada e com isso, favorecer a progressão da patologia ao estabilizar oligômeros mal-formados e dificultar sua

degradação. Essa hipótese é fortalecida pela presença de diversas chaperonas e co-chaperonas nos CL (KISHINEVSKY et al., 2018; URYU et al., 2006). Com isso, pesquisadores investigaram as consequências da inibição específica de HSP90 nas proteínas clientes e observaram que as mesmas sofriam rápida degradação pelo sistema ubiquitina-proteassoma e diminuía o estresse sob neurônios dopaminérgicos da SN *pars compacta* resgatando a viabilidade desses neurônios (ISAACS; XU; NECKERS, 2003; KISHINEVSKY et al., 2018). Outro estudo também identificou que, durante a senescência, as proporções proteicas de chaperonas estão alteradas, podendo favorecer o surgimento e a progressão de patologias associadas a desordens proteicas (BREHME et al., 2014).

O estudo do interactoma tem surgido como uma abordagem contemporânea para se investigar doenças humanas de etiologias desconhecidas (LACKIE et al., 2022). Muitas doenças atualmente intratáveis possuem natureza multifatorial, com estressores de natureza genética, epigenética e ambiental, e a forma como esses componentes conduzem aos fenótipos de doenças permanece desconhecida em vários aspectos. Logo, a abordagem de redes interactômicas em modelos de doenças pode esclarecer a organização de sistemas biológicos e ajudar na compreensão de distúrbios fisiopatológicos (GINSBERG et al., 2022).

2.6 CROSSTALK INFLAMASSOMA-CHAPERONAS

O estado neuroinflamatório crônico, que pode ocorrer devido a uma diversidade de estímulos, tais como lesões, infecções, estresse oxidativo e acúmulo de proteínas anormais – sendo este último marcadamente presente nos distúrbios neurodegenerativos –, está associado à hiperativação do complexo inflamassoma no SNC, em especial do inflamassoma NLRP3 (LI et al., 2021).

A ativação crônica do inflamassoma pode provocar uma série de alterações no SNC, mantendo um estado neuroinflamatório que prejudica diversas funções, tais como: funções sinápticas, associadas a desequilíbrio na liberação de neurotransmissores e danos de memória; estresse oxidativo, associado ao aumento da concentração de espécies reativas de oxigênio; neurodegeneração, associada à ativação de mecanismo de morte celular; e alterações na integridade da barreira hematoencefálica, associadas a infiltrados de células do sistema imune periférico no SNC, contribuindo ainda mais para a resposta inflamatória (JO et al., 2016). Todas essas alterações

contribuem para o desenvolvimento e a progressão dos distúrbios neurodegenerativos e podem acontecer simultaneamente (JO et al., 2016).

As alterações provocadas por um sistema cronicamente inflamado levam ao desequilíbrio de variadas funções, vias e proteínas. Sendo assim, a via das chaperonas se torna um potencial alvo de investigação nesses distúrbios, uma vez que suas funções centrais estão relacionadas à manutenção da proteostase celular, ao dobramento e à correção de proteínas (LACKIE et al., 2017). Além disso, é possível que o estado alterado dessa via, epichaperoma, contribua para a manutenção de proteínas malformadas no sistema, mantendo o gatilho de ativação do complexo do inflamassoma (GINSBERG et al., 2022; RODINA et al., 2016). Este, por sua vez, mantém a neuroinflamação, criando um ciclo vicioso que favorece a progressão da doença e culmina com a neurodegeneração.

2.7 MODELOS ANIMAIS PARA DOENÇA DE PARKINSON

Nenhum modelo de DP recapitula precisamente todos os aspectos da doença. Ter uma maior variedade de modelos para estudar essa doença permite a investigação de seus diferentes aspectos, ajudando a preencher as lacunas fisiopatológicas existentes e identificação de novos tratamentos (DOVONOU et al., 2023). Sendo assim, o modelo de escolha deve considerar a pergunta de pesquisa a que se pretende responder. Existindo modelos genéticos e modelos induzidos por agentes agroquímicos, neurotóxicos, entre outras drogas.

O modelo de parkinsonismo induzido pela reserpina e pelo haloperidol consegue reproduzir bem as características motoras da doença em animais, mas falha na replicação das neuropatologias associadas (LÓPEZ-SENDÓN; MENA; DE YÉBENES, 2013). A exposição a alguns pesticidas, como a Rotenona, Paraquat e Maneb é associada ao desenvolvimento da DP, e esses agrotóxicos são utilizados como modelos da doença em animais (ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016; PETROVITCH et al., 2002). Apesar da Rotenona reproduzir a sintomatologia motora e inclusões de α -syn, é um modelo com alta variabilidade interindividual e que não cruza a barreira hematoencefálica (BHE), dificultando sua aplicabilidade. O Paraquat associado ao Maneb causa ativação microglial e perda de neurônios dopaminérgicos, sendo útil na investigação de fármacos neuroprotetores e possíveis interações gênicas em modelos de *Drosophila* e *C. Elegans* (COOPER; VAN RAAMSDONK, 2018; SOARES et al., 2017).

A DP familiar representa 3-5% do total de casos, e os modelos genéticos apresentam uma ampla variabilidade fenotípica entre espécies, o que pode dificultar sua aplicabilidade em pesquisas

translacionais (DOVONOU et al., 2023). O modelo de *PRKN*, que representa 50% dos casos genéticos de início precoce, e o *PINK*, representando 8% das formas familiares de início precoce, causam alterações motoras, mitocondriais e perda de neurônios dopaminérgicos em *C. Elegans* e *Drosophila*. No entanto, em camundongos, esses modelos não causam patologia da α -syn, alterações comportamentais ou neurodegeneração dopaminérgica antes dos 2 anos (COOPER; VAN RAAMSDONK, 2018; DAWSON; KO; DAWSON, 2010; GREENE et al., 2003). O modelo *PINK* tem sido investigado em primatas não-humanos e, apesar de promissor, ainda precisa de melhor validação (YANG; LI; LI, 2019). O modelo A53T em camundongos apresenta aumento da concentração e agregação de α -syn fosforilada humana em neurônios, resultando em déficits motores e não motores. Embora suas inclusões patológicas não sejam precisamente nas mesmas localizações das lesões humanas, elas compartilham muitas alterações fisiopatológicas tornando esse modelo valioso para investigação de potenciais alvos terapêuticos na formação ou disseminação da α -syn (DOVONOU et al., 2023; MOUGENOT et al., 2011; SORRENTINO et al., 2018).

Uma variedade de toxinas que causam a morte de neurônios dopaminérgicos foi e continua sendo investigada. Isso se baseia na premissa de que a morte dos neurônios dopaminérgicos é estereotipada e estudá-la pode trazer boas perspectivas para a fisiopatologia da doença (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007). Apesar de gerarem conhecimento sobre a neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos, nenhum desses modelos é homólogo à doença. As três toxinas mais comumente utilizadas em modelos neurotóxicos de Parkinson são a 6-Hidroxdopamina (6-OHDA), o MPTP e o Lipopolissacarídeo (LPS). A 6-OHDA, análogo da dopamina altamente oxidável, causa lesão de neurônios DA da via nigroestriatal e alterações motoras e não motoras, mas não replica a patologia de Lewy (DOVONOU et al., 2023; HERNANDEZ-BALTAZAR; ZAVALA-FLORES; VILLANUEVA-OLIVO, 2017). Além disso, a 6-OHDA precisa ser administrada estereotaxicamente por não atravessar a BHE (BRANCHI et al., 2008). O MPTP, análogo da meperidina [heroína sintética], reproduz características clínicas e fisiopatológicas da DP, mas camundongos são menos sensíveis, requerendo doses múltiplas para neurodegeneração dopaminérgica (LANGSTON et al., 1983). O modelo do MPTP também apresenta alta taxa de letalidade nas primeiras 24 horas após a administração, exigindo cautela na interpretação dos resultados experimentais (JACKSON-LEWIS; PRZEDBORSKI, 2007). Por atravessar a BHE pode ser administrado por via sistêmica, sendo rapidamente metabolizado por astrócitos, micrógliia e neurônios DA, causando alterações neuroanatômicas e neuroquímicas da doença (PRZEDBORSKI; VILA, 2003; SCHMIDT; FERGER, 2001).

2.7.1 Modelo LPS de sinucleinopatia

Inicialmente destinado a modelos de inflamação sistêmica e investigação de terapias anti-inflamatórias, o LPS passou a ser utilizado como modelo neurotóxico para a DP após relato de caso clínico e estudos demonstrando sua capacidade de causar morte seletiva de neurônios dopaminérgicos (HERRERA et al., 2000; NIEHAUS; LANGE, 2003; SEEMANN; ZOHLES; LUPP, 2017). Dois cientistas, Niehaus e Lange, reportaram em 2003 o caso clínico de um jovem de 22 anos que, ao se contaminar com LPS, desenvolveu sintomas cardinais da DP [sendo as lesões da SN *pars compacta* e Córtex confirmadas posteriormente por tomografia computadorizada]. Além disso, outros estudos demonstram a capacidade do LPS de causar morte seletiva de neurônios dopaminérgicos e, com isso, o mesmo passou a ser empregado como modelo de DP (HERRERA et al., 2000; NIEHAUS; LANGE, 2003).

Pacientes com DP possuem um aumento da permeabilidade intestinal, permitindo a entrada de produtos tóxicos relacionados à microbiota intestinal na corrente sanguínea. Além disso, a diminuição da proteína sérica Lipopolysaccharide-Binding Protein (LBP) em pacientes com DP está relacionada à exposição crônica ao LPS (ADAMS et al., 2019; FORSYTH et al., 2011; HASEGAWA et al., 2015). Outro estudo demonstrou que a inoculação, por gavagem oral, de uma bactéria gram-negativa patogênica intestinal de camundongos induziu diminuição de neurônios dopaminérgicos no estriado e causou comprometimento motor nos animais (MATHEOUD et al., 2019). Estudos epidemiológicos indicam a relevância do eixo cérebro-intestino na DP, com portadores de doenças auto-imunes gastrointestinais [Doença Inflamatória Intestinal, Doença de Crohn e Colite Ulcerativa] tendo risco aumentado de desenvolver DP (LI et al., 2023). Além da morte de neurônios dopaminérgicos, foi demonstrado que o modelo LPS também causa o aumento da expressão de α -syn no cérebro e a sua oligomerização em CL, o principal marcador histopatológico da doença, bem como um aumento na expressão de citocinas e alteração no perfil da micróglia (CHOI; ZHANG; BING, 2010; ZHANG; XU, 2018). Estudos mecanísticos revelaram que a morte desses neurônios não se deve ao efeito direto do LPS, mas sim aos desdobramentos neurotóxicos causados por este, como a entrada de TNF α no cérebro, acarretando resposta microglial (LIU et al., 2008).

O modelo murino tem sido amplamente difundido por seu baixo custo. O camundongo C57BL/6 é frequentemente escolhido por ser uma excelente plataforma para o estudo de mutações genéticas associadas a doenças, permitindo investigações de double-hit [associando um modelo genético ao modelo LPS, por exemplo] (PIIRSALU et al., 2020; ROCHA-FERREIRA et al., 2015).

A escolha da cepa bacteriana de LPS é relevante no modelo, estando relacionada ao grau de patogenicidade e à ativação da resposta imunológica. Infelizmente, muitos estudos ainda não especificam o LPS utilizado, dificultando a reprodutibilidade, e ainda há uma carência de literatura que caracterize e diferencie bem o modelo. Alguns estudos utilizando a cepa *Salmonella abortusequi* induziram neurodegeneração na SN de camundongos após administração sistêmica de LPS (1 µg/g/dia) (BEIER et al., 2017; BODEA et al., 2014; MILDE et al., 2021). No entanto, a mesma dose com a cepa de *Escherichia Coli* gerou uma reação inflamatória sistêmica intensa, resultando na morte dos animais em outro estudo, sendo que os efeitos com doses baixas de LPS cepa *Escherichia Coli* ainda precisam ser mais extensamente caracterizados (DENEYER et al., 2019a; DENG; BOBROVSKAYA, 2022a).

Variações no modo de indução da DP por LPS causam fenótipos clínicos diferentes nos animais. A escolha estratégica para a modulação do modelo envolve o número de dias de aplicação do LPS (com uma ou mais aplicações consecutivas) e a dose administrada. A administração de uma única dose é capaz de causar neurodegeneração dopaminérgica de 7-10 meses após a indução, enquanto doses consecutivas antecipam o aparecimento de sintomas (DENG et al., 2020). Doses únicas mais elevadas [5 mg/Kg] são capazes de causar neurodegeneração tardia no córtex motor, hipocampo e aumento da permeabilidade intestinal, mas também são acompanhadas de uma maior toxicidade e um longo período de acompanhamento até que os animais apresentem o quadro clínico (DENG; BOBROVSKAYA, 2022a). Enquanto concentrações menores repetidas de LPS causam alterações mais precoces (de 1-6 semanas após o término da indução), como o aumento da expressão de α -syn, alterações cognitivas e olfativas, não sendo encontradas alterações motoras (DENG; BOBROVSKAYA, 2022a; MILDE et al., 2021; ZHANG; XU, 2018). Cabe ressaltar que a literatura retrata diferenças entre os sexos no modelo LPS (DENG; BOBROVSKAYA, 2022a; SAVI et al., 2021). Uma maior quantidade de estudos apresentando essas diferenças entre machos e fêmeas foram feitos com ratos (CLOUTIER; KAVALIERS; OSSENKOPP, 2017; DOENNI et al., 2017; MACRAE et al., 2015). Os estudos com camundongos são majoritariamente feitos com camundongos machos. Os que foram realizados em camundongos fêmeas relataram que o modelo de única dose não funciona em fêmeas e que o modelo de doses consecutivas precisa ser ajustado para aplicações consecutivas mensalmente para funcionar, justificando poder existir um fator hormonal protetor (LIU et al., 2008; SAVI et al., 2021). No entanto, essa argumentação é controversa, visto que há uma escassez de estudos com camundongos fêmeas no modelo, necessitando de maiores investigações (HOOGLAND et al., 2015).

A escolha da via de administração [estereotáxica, nasal ou sistêmica] também promove fenótipos diferentes. Apesar da administração estereotáxica garantir que o LPS alcance a região de

interesse, a patologia se torna limitada ao local da administração, não mimetizando bem o cenário da doença em humanos. Já nas administrações por via nasal e sistêmica, os animais reproduzem de forma mais fiel o quadro clínico da doença, havendo progressão da sintomatologia não motora para a motora. É importante ressaltar que a via intranasal requer um período de indução mais prolongado (1 mês ou mais). Por último, a idade dos animais também interfere no modelo: camundongos mais velhos apresentam fenótipo mais grave da doença, o que condiz com os achados em humanos (CHOI et al., 2009; ZHANG et al., 2005).

3 JUSTIFICATIVA

As desordens neurológicas emergem como a principal causa de incapacidades no mundo, com a doença de Parkinson destacando-se como uma das patologias de maior crescimento. A complexidade da DP é evidenciada pela variabilidade significativa na progressão da doença entre os pacientes, constituindo um desafio a compreensão de sua fisiopatologia.

A DP não se manifesta como uma alteração homogênea, demandando uma abordagem cuidadosa e diferenciada para decifrar seus mecanismos subjacentes. Adicionalmente, é crucial destacar que suas atuais abordagens terapêuticas são sintomáticas, carecendo de abordagens que atuem diretamente na prevenção ou desaceleração da progressão da doença.

Diante desse cenário, a presente pesquisa visa a explorar novas perspectivas na fisiopatologia das sinucleinopatias, com um enfoque específico na fase prodrômica. Essa abordagem estratégica aborda a lacuna existente na compreensão dos estágios iniciais da doença e também oferece a possibilidade de identificar novos marcadores e alvos terapêuticos. A investigação dessas vias pode representar um avanço significativo na compreensão e tratamento eficaz de sinucleinopatias, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas inovadoras.

4 HIPÓTESE

A administração de LPS (lipopolissacarídeo) sistêmico na dose de 250 µg/kg, repetida diariamente por um período de 7 dias consecutivos, é capaz de induzir sinucleinopatía via a alteração de componentes dos complexos do Inflamassoma e das Chaperonas em camundongos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar modelo de sinucleinopatia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) investigando o desenvolvimento de alterações comportamentais e clínicas, bem como alterações nas vias do Inflamassoma e das Chaperonas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar alterações comportamentais e clínicas em modelo experimental de sinucleinopatia induzida por LPS sistêmico;
- Identificar a concentração de marcadores pró-inflamatórios e fatores neurotróficos na substância negra, estriado e hipocampo;
- Investigar a expressão de componentes das vias do Inflamassoma e das Chaperonas na substância negra, estriado e hipocampo;
- Investigar se há a presença de alfa sinucleína fosforilada na substância negra, estriado e/ou no hipocampo.

6 MÉTODOS

6.1 APROVAÇÃO ÉTICA PARA ESTUDO EM ANIMAIS

Os experimentos foram conduzidos em camundongos machos C57BL/6. Os animais foram adquiridos junto ao Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (CEBIO) da UFMG e permaneceram no Biotério de Camundongos do Departamento de Morfologia da UFMG durante todo o período experimental. O manejo, uso e os procedimentos experimentais foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG, sob o número 255/2017 (CEUA-UFMG).

Para proporcionar maior conforto aos animais, eles foram alojados em mini-isoladores com filtro e ventilação individuais, dispostos em racks específicos para camundongos (Alesco, Brasil), e mantidos em condições ambientais padronizadas (22 ± 2 °C; umidade $65 \pm 5\%$; ciclo claro/escuro de 12 horas invertido). Todos os animais tiveram acesso irrestrito a ração e água potável, sendo a maravalha trocada semanalmente.

6.2 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos C57BL/6 selvagens, com idade entre 10 e 11 semanas e peso corporal variando entre 18 e 22g, distribuídos em dois grupos distintos:

- Grupo Controle: recebeu injeção intraperitoneal (volume final de 100 μ L) de salina 0,9% (SF).
- Grupo LPS: recebeu injeção intraperitoneal (volume final de 100 μ L) de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 0111.4 (Sigma-Aldrich, EUA) na dose de 250 μ g/kg/dia.

6.3 MODELO MURINO DE SINUCLEINOPATIA

A seguir, apresenta-se uma ilustração esquemática do desenho experimental do modelo (Figura 7). A indução da sinucleinopatia ocorreu por meio da administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* 0111.4 (Sigma-Aldrich, EUA), em doses diárias de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$, por 7 dias consecutivos, em um volume final de 100 μL , sem a necessidade de anestesia. Os animais do Grupo Controle receberam doses diárias de solução salina 0,9%, em um volume final de 100 μL , por via intraperitoneal, também ao longo de 7 dias consecutivos, sem a utilização de anestesia. Os animais foram pesados diariamente durante o período da indução.

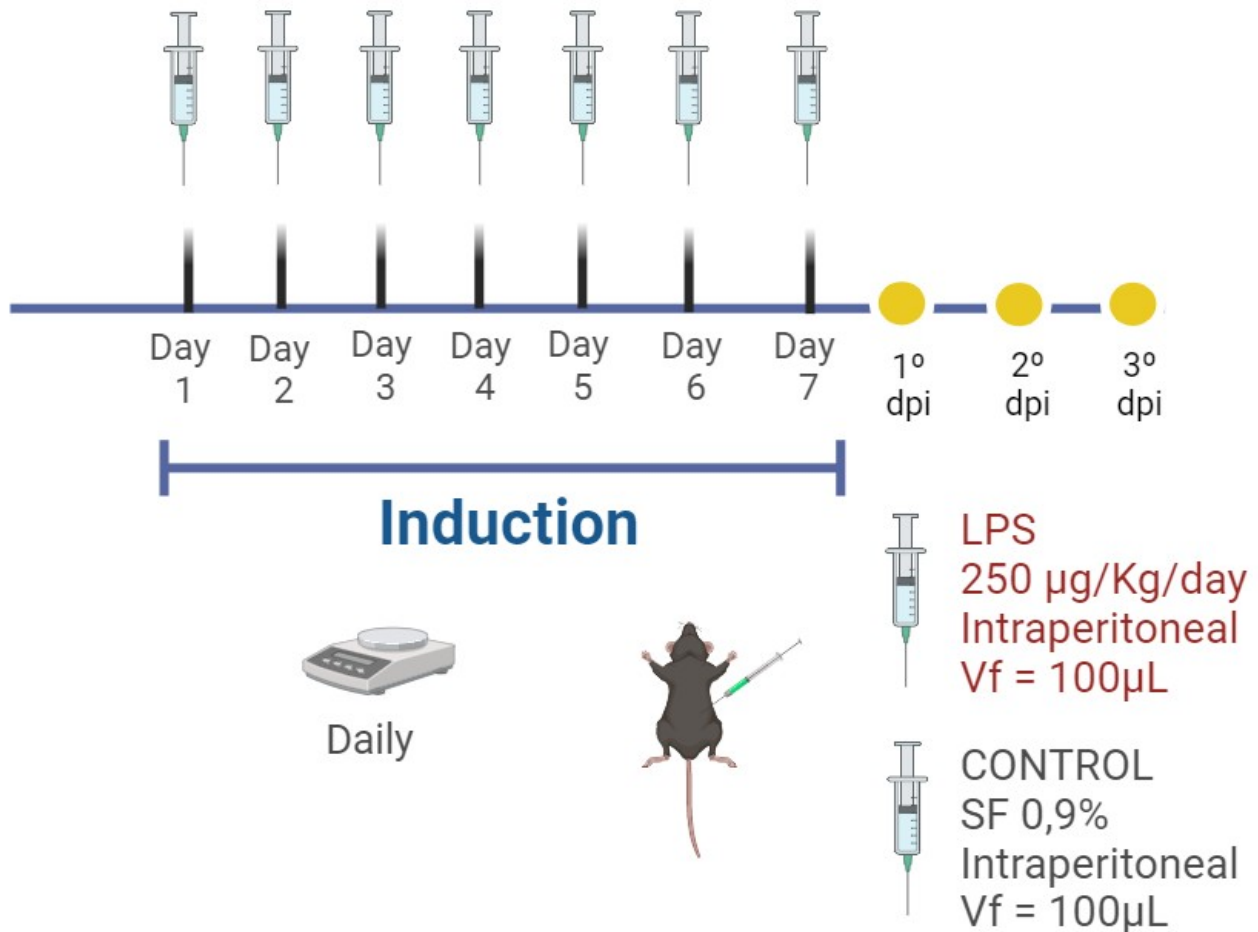


Figura 7 - Modelo esquemático da indução. Realizada por 7 dias consecutivos. O Grupo Controle recebeu injeção intraperitoneal (volume final de 100 μL) de salina 0,9% (SF) e o Grupo LPS recebeu injeção intraperitoneal (volume final de 100 μL) de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* 0111.4 (Sigma-Aldrich, EUA) na dose de 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$. Os animais foram pesados diariamente durante a indução.

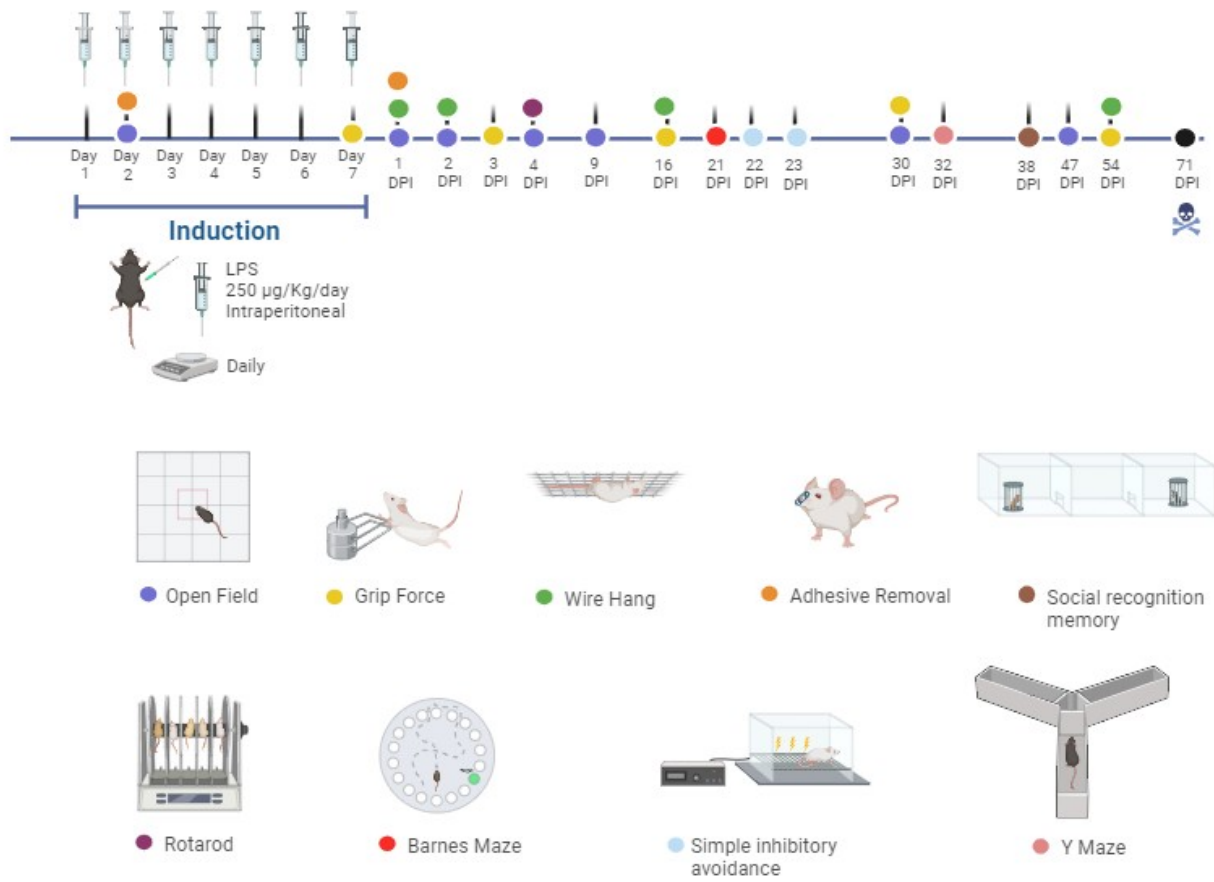


Figura 8 - Modelo resumo do desenho experimental utilizado. Linha do tempo com a marcação do período de indução e o período pós indução (dpi). Testes comportamentais sinalizados por cores. *Time points* para análises moleculares, 4dpi e 23 dpi.

6.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

6.4.1 Teste de Campo Aberto - (Open Field Test - OPF)

O Teste de Campo Aberto (OPF) é amplamente empregado em estudos neurobiológicos para avaliar a atividade exploratória, comportamentos do tipo ansioso e a atividade locomotora em camundongos, sendo considerado padrão-ouro para esta última (LAU et al., 2008). Animais sem um bom estado geral¹ ou com comportamento do tipo depressivo geralmente apresentam menor atividade locomotora. Por outro lado, animais sob estresse tendem a exibir comportamentos estereotipados, como coçar (*scratching*), se limpar (*grooming*) e se levantar (*rearing*) (Figura 9) (KALUEFF, 2006). Já camundongos com comportamento do tipo ansioso tendem a explorar mais as áreas periféricas da arena em detrimento da região central (figura 10) (BALE et al., 2000). Todos esses comportamentos são passíveis de análise no OPF.

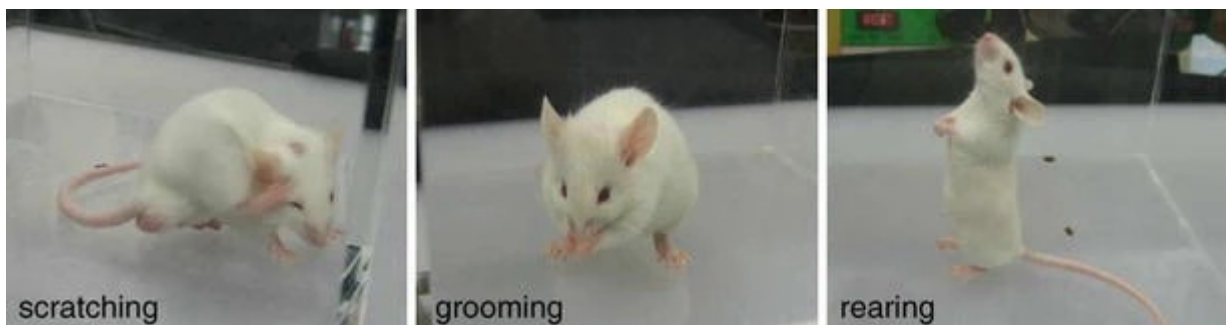


Figura 9 - Esteriotipias relacionadas ao estresse em murinos. Adaptado de (Nie et al., 2009).

¹Pelagem arrepiada e/ou opaca, fezes ressecadas, perda de peso excessiva, hipoatividade entre outras características.

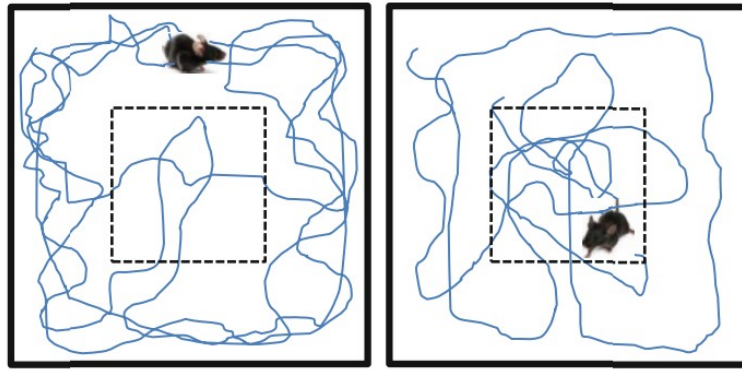


Figura 10 - Arena do Teste de Campo Aberto. Camundongo explorando a borda da arena x camundongo explorando região central da arena. Adaptado de (Kraeuter et al., 2019).

Para a aquisição dos dados do Teste de Campo Aberto (OPF), foram utilizadas quatro câmaras quadradas da marca Phenotyper Noldus, cada uma com paredes opacas medindo 30 cm de lado. Cada câmara estava equipada internamente com uma câmera digital e luz infravermelha, permitindo a captura dos movimentos dos animais durante os experimentos. As imagens foram transmitidas para o software EthoVisionXT, onde também foram armazenadas, possibilitando a delimitação de zonas de centro e borda para análise posterior dos resultados.

As quatro câmaras Phenotyper Noldus, em associação com o software EthoVisionXT, possibilitaram a análise simultânea de quatro camundongos, estando cada um em sua respectiva câmara. A distância total percorrida por cada animal foi mensurada em centímetros (cm), e o tempo, em segundos (s). No início do teste, cada camundongo foi colocado na parte interna de sua respectiva câmara, onde permaneceu por um período de 30 minutos.

Parâmetros como a distância total percorrida, o número de entradas na zona central da arena e a relação entre o tempo que o animal permaneceu na zona central da arena pelo tempo que permaneceu na zona de borda da arena foram registrados pelo software EthoVisionXT, desenvolvido pela Noldus Information Technology (Leesburg, VA, EUA), e posteriormente submetidos a análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 6.

6.4.2 Teste de Força de Preensão (Grip Force Test - GFT)

O Teste de Força de Preensão (GFT) foi empregado para avaliar a força de tração dos animais. Durante o teste, o operador aplicou força, puxando o animal pela cauda com firmeza

crescente para fora das grades do dispositivo, as quais foram projetadas para a pegada do camundongo (Figura 11) (BERTELLI; MIRA, 1995). O teste foi aplicado para avaliar a força tanto nos membros anteriores quanto nos quatro membros. Foram obtidas três medidas consecutivas de força para cada animal. Na análise dos dados, calculou-se a média das três aferições consecutivas por animal e multiplicou-se o resultado por 9,8 para obter a força em Newton, unidade de medida padrão para força.



Figura 11 - Teste de Força de Preensão. Adaptado de (Nordmann, 1985).

6.4.3 Wire Hanging Test

O Teste Wire Hanging é utilizado para detectar anormalidades neuromusculares de força muscular e é frequentemente empregado para avaliar alterações neuromusculares básicas em modelos animais de Doença de Parkinson (“Wire Hanging Test”, [s.d.]). Para este teste, foi utilizada uma grade com trama adequada para que o animal pudesse se segurar com os quatro membros (Figura 12). A grade foi posicionada a uma altura de aproximadamente 40 cm, suficiente para evitar que o camundongo pulasse, mas ao mesmo tempo evitando danos caso o animal viesse a cair. O

tempo de latência da queda do animal foi medido em segundos, respeitando um tempo mínimo de latência de 15 segundos e um tempo máximo de 180 segundos. O teste foi aplicado por três vezes consecutivas, com um intervalo de descanso para os animais de 30 segundos entre cada aplicação.



Figura 12 - Teste Wire Hang. Adaptado de (Nordmann, 1985).

6.4.4 Teste de Retirada de Adesivo de Ponta Nasal (Adhesive Removal Test)

O Teste de Retirada de Adesivo (Figura 13) de Ponta Nasal permite avaliar tanto a função somatossensorial quanto motora dos camundongos. O teste consiste em aplicar pequenas tiras adesivas sobre o focinho dos animais, registrando o tempo gasto pelo animal para remover o adesivo. É crucial que o tamanho das fitas adesivas seja uniforme, pois variações podem prejudicar a precisão dos resultados, e o posicionamento das fitas deve ser o mais semelhante possível entre os animais (BOUET et al., 2009). O teste foi conduzido com três repetições consecutivas e a média do tempo gasto por animal (em segundos) foi calculada para análise posterior dos dados. Realizou-se o teste com o animal dentro de uma caixa contendo uma pequena quantidade de maravalha da sua caixa de origem, com o objetivo de reduzir o estresse durante o teste.

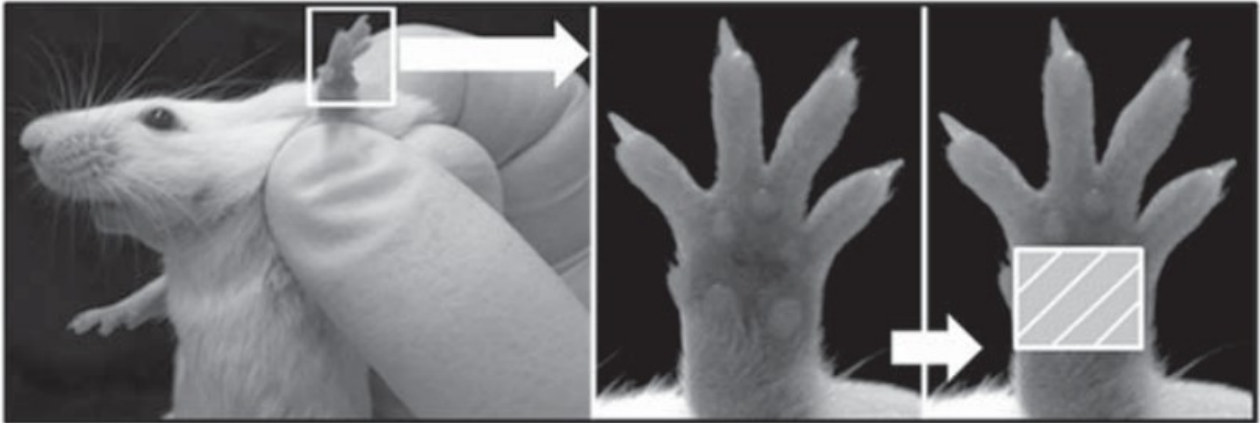


Figura 13 - Teste de Remoção de Adesivo. Pode ser aplicado sobre a narina do animal ou em um dos membros anteriores. Adaptado de (Bouet et al., 2009).

6.4.5 Teste Rotarod

O teste Rotarod, inicialmente descrito por Dunham e Miya para detecção de déficits neurológicos, é atualmente utilizado de forma tradicional para avaliar a coordenação motora em modelos murinos (DUNHAM; MIYA, 1957). O aparelho consiste em uma haste giratória posicionada em uma altura que desencoraja os animais de pular e é ajustável em termos de velocidade (Figura 14) (LUBRICH; GIESLER; KIPP, 2022). Os resultados foram obtidos com base no tempo de latência que cada animal levou para a primeira queda e no número de quedas que cada animal apresentou durante um período de 5 minutos (duração do teste). O aparelho foi programado para atingir a velocidade máxima de 20 rpm.

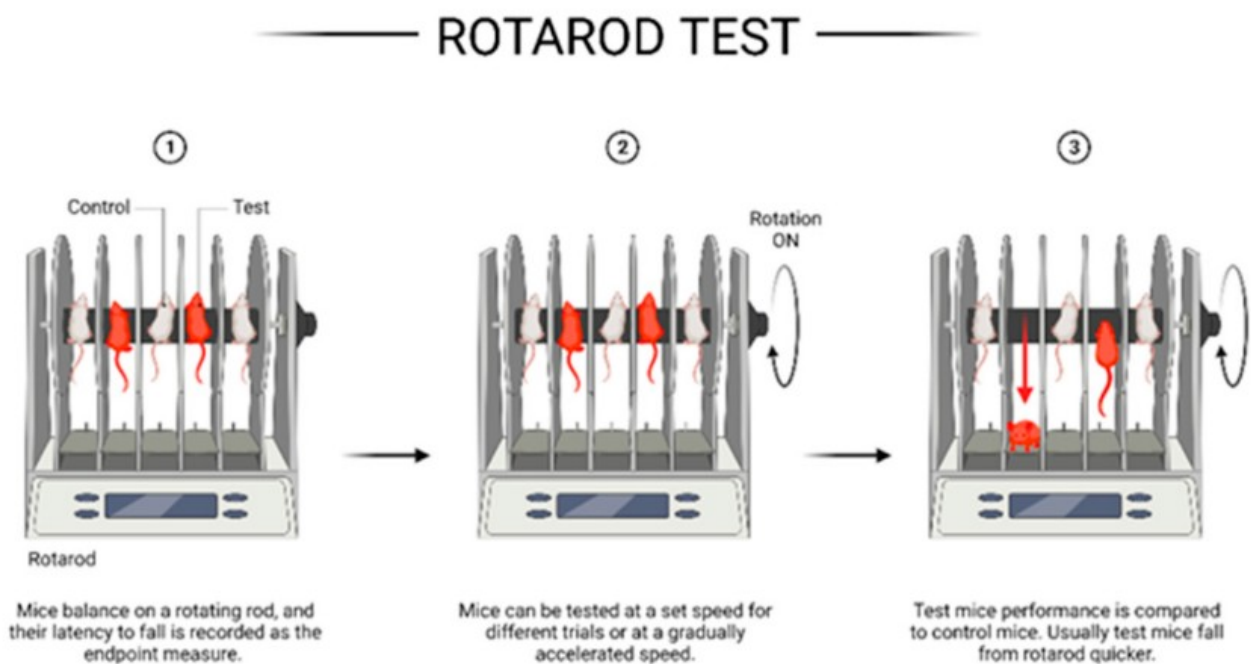


Figura 14 - Ilustração Aparato Rotarod. Adaptado de (Lubrich et al., 2022).

6.4.6 Teste Barnes Maze

O Teste Barnes Maze é utilizado para avaliar a aprendizagem espacial dependente da memória hipocampal. Conceitualmente, é um teste semelhante ao Morris Water Maze Test, sendo uma alternativa que não exige o comportamento de natação, considerado extremamente estressante para os animais (PITTS, 2018).

O teste fundamenta-se na capacidade dos animais em aprender a rota de fuga/escape (fixa) por meio de pistas ambientais. Ele ocorre em um ambiente intencionalmente aversivo, em uma plataforma branca, ambiente muito iluminado e espaços abertos. O aparato consiste em uma plataforma circular branca, elevada do chão, com orifícios distribuídos uniformemente na borda (Figura 15). Um desses orifícios leva a um túnel de fuga, mantido no mesmo local durante todo o experimento. O treinamento para o teste teve duração de 9 dias, com a aplicação do teste no dia seguinte à finalização do treinamento (10º dia). O protocolo utilizado neste estudo foi o mesmo apresentado por (PITTS, 2018).

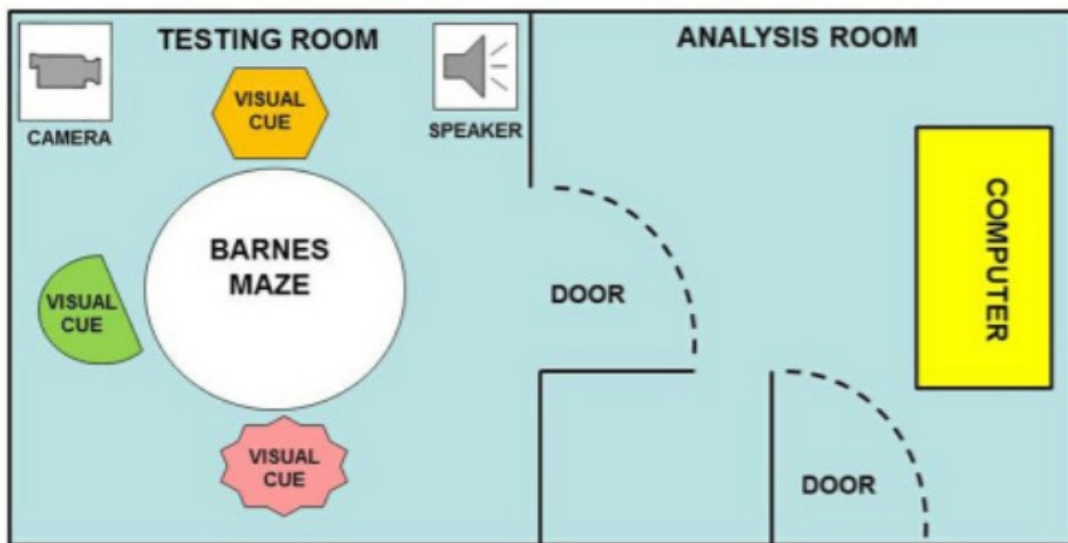


Figura 15 - Ilustração-esquema Teste Barnes Maze. Imagem retirada do google.

6.4.7 Teste da Esquiva Inibitória (Simple Inhibitory Avoidance)

O Teste de Esquiva Inibitória baseia-se na aprendizagem associativa entre um estímulo condicionado² e um estímulo incondicionado³. Ele permite avaliar a capacidade do animal de aprender uma tarefa aversiva e evitá-la (IZQUIERDO; MCGAUGH, 2000). Nesse teste, utiliza-se um aparato com uma plataforma onde o animal é colocado. Assim que o camundongo desce da plataforma, ele recebe um choque nas patas. Os animais que associam o aparato ao choque tendem a apresentar uma resposta estereotipada de congelamento [freezing] e aumentar o tempo de latência de descida da plataforma nas próximas vezes que são colocados nela, demonstrando lembrança da situação aversiva (choque). Animais com dificuldades na aquisição de memória tendem a ter um menor tempo de latência de descida e não apresentar congelamento.

O aparato de esquiva inibitória (Figura 16) consiste em uma caixa de acrílico com uma plataforma localizada no lado direito, sendo o piso da caixa formado por uma grade. Durante a sessão de treino, os animais foram colocados sobre a plataforma e, ao descenderem para a grade com as quatro patas, receberam um choque de baixa voltagem. Após o animal retornar à plataforma, ele foi retirado do aparato e colocado de volta em sua caixa. Duas sessões foram realizadas após o treino: a

² Estímulo condicionado ou estímulo neutro quando aplicado não desencadeia uma resposta específica do animal.

³ Estímulo incondicionado desencadeia uma resposta inata/específica, ou seja, o animal exibe uma resposta naturalmente, devido a sua conexão com a sobrevivência, não requerendo aprendizado.

primeira 1h30 após o término da sessão de treino (avaliação da memória de curta duração) e a segunda 24 horas após o término da sessão de treino (avaliação da memória de longa duração). O tempo de latência para descer da plataforma até a grade foi registrado para cada animal em ambas as sessões e posteriormente analisado.



Figura 16 - Aparato Teste Esquiva Inibitória. Foto retirada do Google.

6.4.8 Teste do Labirinto em Y (Y Maze Test)

O teste do labirinto em Y é utilizado para avaliar o desempenho da memória de trabalho imediata dos animais por meio da análise da alternância entre os braços do labirinto (Figura 17) (DE CASTRO et al., 2009). Animais com boa memória de trabalho espacial tendem a evitar entrar no último braço recentemente explorado, resultando em um maior índice de alternância.

No teste, cada camundongo foi colocado no mesmo braço do labirinto (A) e deixado se mover livremente por 5 minutos. Após o teste, o camundongo foi retirado e colocado em sua caixa. Após a realização do teste com todos os animais, os vídeos foram analisados, contabilizando a alternância entre os braços. O índice de alternância considera as sucessivas entradas nos três diferentes braços de maneira consecutiva. O número total de entradas foi calculado como o total de mudanças de braços. A porcentagem de alternância foi calculada pela fórmula: $[\text{alternância total}/(\text{braços totais inseridos} - 2)] \times 100$.

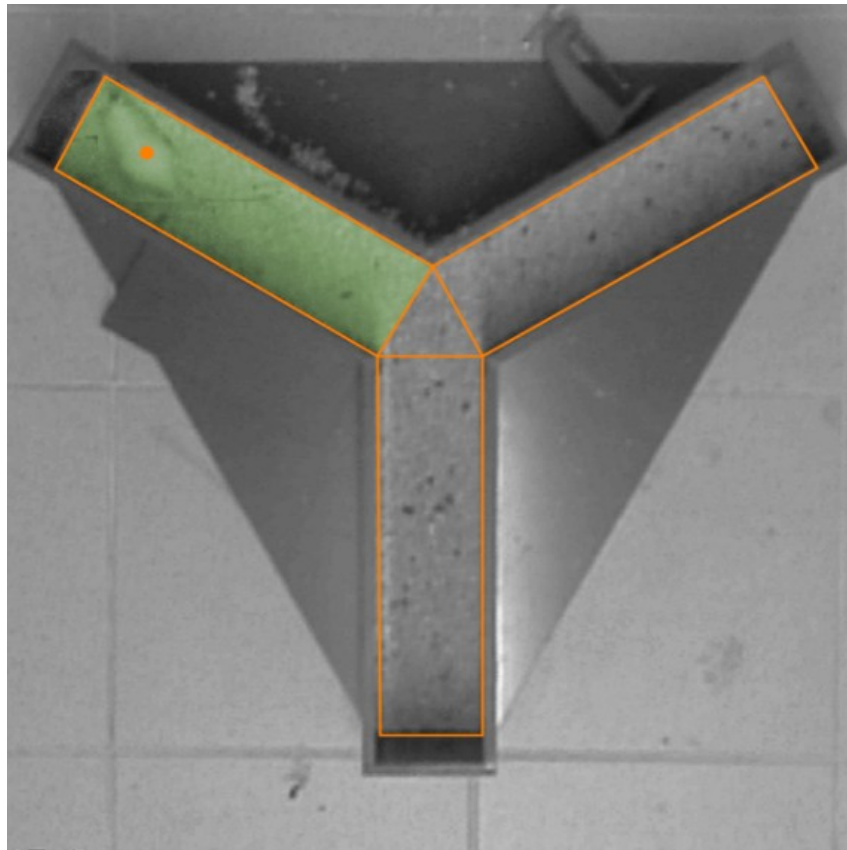


Figura 17 - Aparato Teste do Labirinto em Y. Utilizado para avaliação da memória de trabalho. Imagem retirada do google.

6.4.9 Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras (Three-Chamber Sociability and Social Novelty Test)

O teste de Reconhecimento de Memória Social de Três Câmaras é um teste que explora a sociabilidade e o interesse por novidade social de camundongos em modelos de desordens do SNC

(figura 17) (“Sociability and Social Novelty Test”, 2024). Animais saudáveis tendem a passar mais tempo com outro roedor do que sozinhos (princípio da sociabilidade) e preferem explorar por mais tempo o ambiente com um animal desconhecido do que o ambiente com um animal conhecido (princípio da novidade social).

O aparato para realização do teste consiste em um caixa retangular acrílica com três câmaras que se intercomunicam entre si, sendo que cada câmara possui dimensões de 20x40x20cm, conforme mostrado na Figura 18.



Figura 18 - Aparato do Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras. Adaptada de (Social Behavior | Neural Circuits and Behavior Core, [s.d.]).

Os animais com 38 dpi passaram pelo Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras para avaliação da memória social de curto prazo. O teste foi baseado em três sessões. Na primeira, de habituação, o camundongo foi colocado na câmara central e pôde explorar as 3 câmaras vazias por cinco minutos. Na segunda sessão, de sociabilidade, com duração de 10 minutos, um animal desconhecido pelo animal em teste (estranho 1) foi colocado na câmara da direita dentro de um cilindro transparente, de 8 cm de diâmetro por 15 cm de altura, com vários furos sobre sua superfície, de modo que os animais pudessem manter contato pelas narinas, mas que impossibilitasse o combate entre eles. A última sessão, de memória, aconteceu após 1 hora e 30

minutos da segunda sessão. Nela, o animal em teste retorna ao aparato, que agora terá, além do animal da direita, um novo animal desconhecido pelo animal em teste, na arena da esquerda e sob as mesmas condições do animal da direita.

A análise do teste foi baseada na trajetória e no tempo em que o animal em teste despendeu em cada câmara com o estranho 1 e com o estranho 2. As imagens foram gravadas e analisadas pelo software EthoVisionXT e posteriormente submetidas a análise estatística utilizando o software GraphPad Prism 6.

6.5 MEDIDAS DE EXPRESSÃO EM TEMPO REAL (RT-PCR)

Amostras

Amostras do Sistema Nervoso Central (SNC), incluindo o Hipocampo, Substância Negra e Estriado, foram obtidas de um grupo de 27 animais, divididos em 14 do grupo controle e 13 do grupo LPS. Após a dissecação, as amostras foram imediatamente armazenadas em tubos Eppendorf previamente identificados e conservadas em um freezer a -80°C para a preservação adequada até o processamento e extração subsequente de RNA.

Processamento das amostras em TRIzol (Invitrogen®)

Antes da extração de RNA, as amostras de tecido nervoso foram processadas utilizando o reagente TRIzol, seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 300 mg de tecido foram homogeneizados em 500 μl de TRIzol por amostra, utilizando um processador ultrassônico. As amostras foram armazenadas a -20°C por uma noite e, em seguida, incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente para garantir a completa dissolução do tecido.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a $12.000 \times g$ a 4°C , resultando na separação do material em três fases. A fase superior, aquosa e que contém o RNA, foi recolhida e transferida para um novo tubo Eppendorf.

Extração de RNA total

Para precipitação do RNA, foi adicionado 0,5 mL de isopropanol à fase aquosa. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 x g a 4°C. Após esse procedimento, o RNA precipitou-se no fundo do tubo, sendo o sobrenadante pipetado e descartado. Em seguida, foi iniciada a etapa de lavagem do RNA.

Primeiramente, adicionou-se 1 mL de etanol a 75%, e, após leve agitação, as amostras foram brevemente homogeneizadas em um vortex, por 5 minutos, a 7500 x g a 4°C. O sobrenadante foi vertido, e o tubo Eppendorf foi mantido virado para secagem por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, a etapa de solubilização foi iniciada com a ressuspensão do pelete em 20-50 µL de água tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC). As amostras foram incubadas a 55°C por 10 minutos.

A concentração e pureza do RNA foram medidas por espectrofotometria NanoDrop Lite (Thermo Scientific). Todos os procedimentos foram realizados com materiais autoclavados, plásticos e reagentes livres de RNase.

Síntese de cDNA

A síntese do cDNA foi realizada a partir do RNA extraído utilizando o Kit de Síntese de cDNA da BIO RAD. Inicialmente, foram adicionados aos tubos de amostras mixes de Dnase (0,5 µL) e Dnase Buffer (1,5 µL) para degradação do DNA e eliminação de possíveis contaminações. Após homogeneização das amostras por pipetagem, elas foram submetidas a um termociclador (25°C por 5 minutos para digestão do DNA, 75°C por 5 minutos para inativação da Dnase e resfriamento a 4°C para a etapa subsequente).

A síntese do cDNA foi iniciada em seguida. Um micrograma de RNA total da amostra foi adicionado a uma solução contendo oligo(dT), desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) e água DEPC. Após homogeneização, foi realizada outra etapa de termociclagem, com uma etapa inicial de 5 minutos a 25°C, seguida pela Transcriptase Reversa (RT) a 46°C por 20 minutos, inativação da RT a 95°C por 1 minuto e resfriamento a 4°C. Ao final, as amostras foram armazenadas a -20°C.

Análises de expressão gênica por RT-qPCR

Este estudo seguiu os critérios estabelecidos nas diretrizes MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) (SA et al., 2009). Inicialmente, os cDNAs foram diluídos na proporção de 1:10 em água milli-Q. Em seguida, 2 µL de cada amostra foram

adicionados a uma mistura contendo 5 μL de iTaq SYBR Green Supermix (iQTM Universal SYBR[®] Green Supermix, Bio-Rad), 2 μL de água milli-Q e 0,5 μL de cada iniciador a 10 μM . Essas etapas foram realizadas em placas Axygen de 96 poços.

Após o preparo das placas, estas foram seladas, homogeneizadas com vórtex e centrifugadas a 1200 RPM por 7 minutos a 4°C para posterior leitura em um termociclador (CFX96 Touch, Bio-Rad). No termociclador, ocorreram as seguintes etapas: desnaturação, anelamento, extensão, detecção de fluorescência e quantificação. A leitura de cada placa durou duas horas.

Análise de Dados

Os resultados da RT-qPCR foram analisados utilizando o software CFX Manager (Bio-Rad) e salvos no formato Microsoft Excel para cálculos subsequentes. A expressão relativa dos genes foi calculada utilizando o método do Ciclo Limiar (Ct, cycle threshold) com a seguinte equação: $2^{(-\Delta\text{Ct})}$, onde $\Delta\text{Ct} = \text{Ct} (\text{gene alvo}) - \text{Ct} (\text{gene normalizador})$. Utilizamos o gene Rpl32 como normalizador.

Para calcular o fold change, usado para determinar as diferenças na expressão gênica entre os grupos, empregamos o método de Livak, $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$, onde $\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{tratado}) - \Delta\text{Ct} (\text{controle})$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Os valores finais foram exportados para o programa GraphPad Prism 6 para posterior plotagem gráfica e análises estatísticas.

6.6 MEDIDAS DE COMPONENTES POR ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO

A quantificação de citocinas e fatores neurotróficos (CX3CL1, IL1 β , IL18, IL17, BDNF, NGF e GDNF) foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com as instruções do fabricante R&D Systems DuoSet, medindo a absorbância a 490 nm.

Amostras

Inicialmente, as amostras foram maceradas com um processador ultrassônico e, em seguida, centrifugadas por 20 minutos a 16.000 rpm a 4°C. O sobrenadante resultante foi cuidadosamente

coletado e transferido para um novo tubo Eppendorf previamente identificado, aguardando análises subsequentes.

Preparação da placa

Foram adicionados 50 μL por poço do anticorpo de captura (R&D Systems DuoSet) na placa apropriada (Maxisorp®, Nunc). A placa foi selada e incubada por 16 horas a 4°C. Posteriormente, o conteúdo da placa foi removido e a mesma foi lavada três vezes com tampão de lavagem (PBS1X contendo 0,5% de Tween). Em seguida, foram adicionados 200 μL por poço do tampão de bloqueio (PBS1X contendo 1% de BSA) e a placa foi incubada em temperatura ambiente por uma hora. Após o período de incubação, a placa foi submetida a três lavagens consecutivas com tampão de lavagem.

Ensaio

Neste momento, foram adicionados 50 μL dos padrões + 50 μL das amostras a cada poço. A placa foi vedada e incubada por 16 horas a 4°C novamente. Após a remoção de todo o conteúdo da placa e a lavagem, como descrito anteriormente, foram adicionados 28 μL do anticorpo de detecção biotilado por poço. A placa foi incubada à temperatura ambiente por mais 2 horas. Após a remoção do conteúdo e outra rodada de lavagens, adicionou-se 50 μL de estreptavidina-HRP a cada poço. A placa foi incubada por 30 minutos, com esta etapa realizada ao abrigo da luz. Após descarte e novas lavagens, adicionou-se 50 μL da solução substrato (OPD) a cada poço e a placa foi incubada novamente por 30 minutos ao abrigo da luz. Por fim, adicionou-se 50 μL de solução de parada à placa e realizou-se a leitura (490 nm) em um leitor de microplacas (Multiskan FC, ThermoScientific).

6.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. A normalidade da distribuição dos resultados foi avaliada por meio do Teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram comparadas utilizando o Teste T, enquanto o Teste T de Welch foi empregado para amostras com variâncias desiguais. O nível de significância adotado foi $p < 0,05$. A

criação dos gráficos e a realização das análises estatísticas foram conduzidas com o auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

7 RESULTADOS

7.1 LPS INDUZ PERDA DE PESO E ALTERAÇÃO TRANSITÓRIA DA ATIVIDADE LOCOMOTORA

Os resultados deste estudo indicam que mesmo pequenas doses de LPS (250 µg/kg/dia) foram capazes de induzir perda de peso em camundongos durante os primeiros dias da indução (2º e 3º dias). Entretanto, é importante notar que os animais apresentaram recuperação de peso já no quarto dia durante a indução. O grupo Controle, que recebeu 100 µL de solução salina a 0,9% via intraperitoneal, manteve uma média de peso constante ao longo de todo o período de intervenção, conforme esperado (Gráfico 1A).

Com relação à atividade locomotora, o tratamento com o LPS causou déficit locomotor durante a fase de indução, persistindo até o quarto dia pós-indução (Gráficos 1B-D e 2E). Contudo, é relevante destacar que, a partir do nono dia pós-indução (Gráfico 2F-H), não foi mais observado déficit locomotor nos animais do grupo LPS.

Esses achados indicam que o tratamento com LPS teve um impacto significativo no peso corporal e no comportamento locomotor dos camundongos durante a fase de indução, com sinais de recuperação posteriormente.

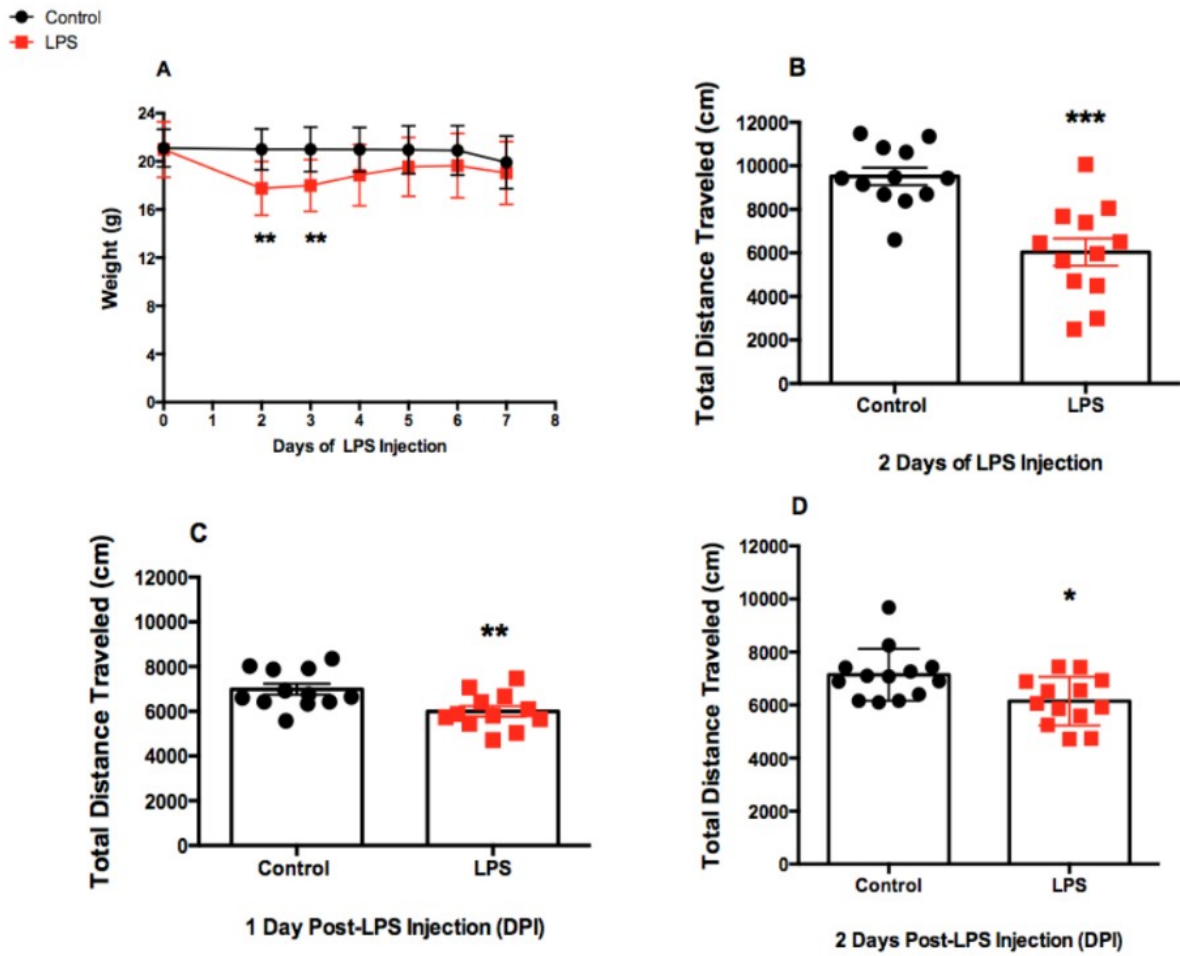


Gráfico 1 - Efeitos do LPS na peso e na distância total percorrida no OPF. (A) Perda de peso durante a indução ($P_2 < 0,0024$ e $P_3 < 0,0061$). (B-D) Distância total percorrida em diferentes momentos do modelo. (B) ($P < 0,0001$) (C) ($P < 0,0076$) (D) ($P < 0,132$) Os símbolos representam os animais de cada grupo por dia de teste. (N= 12).

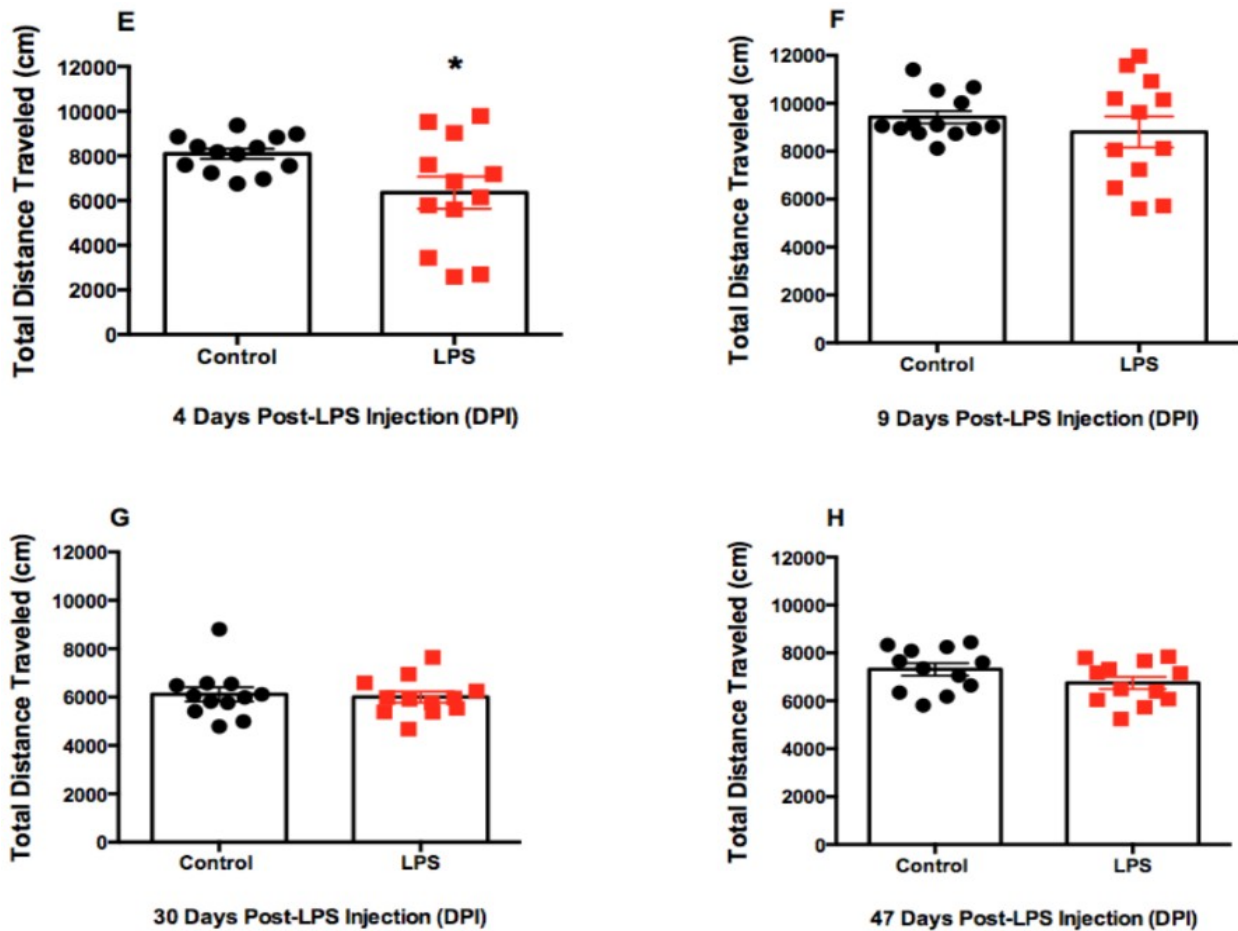


Gráfico 2 - Efeitos do LPS na distância total percorrida no OPF. (E-H) Distância total percorrida em diferentes momentos do modelo. (E) ($P < 0,0261$). (N = 12).

7.2 LPS ALTERA MEMÓRIA HIPOCAMPAL E DE TRABALHO

O grupo tratado com LPS levou mais tempo para encontrar a rota de escape no 21º dpi, conforme demonstrado pelo Teste de Labirinto de Barnes (Gráfico 3A). Esse resultado sugere uma deterioração da memória hipocampal nesse grupo. No 32º dpi, os animais do grupo LPS também exibiram prejuízo na memória de trabalho, indicada por um índice de alternância menor no Teste do Labirinto em Y (Gráfico 3D). A dificuldade prolongada em encontrar a rota de escape e a redução na alternância dos braços do labirinto em Y sugerem impactos a médio prazo do LPS na função cognitiva desses animais. Não observamos diferenças motoras e cognitivas entre os grupos para

outros testes comportamentais aplicados, aqui apresentados na seção Apêndice como resultados suplementares (gráficos 48 ao 62).

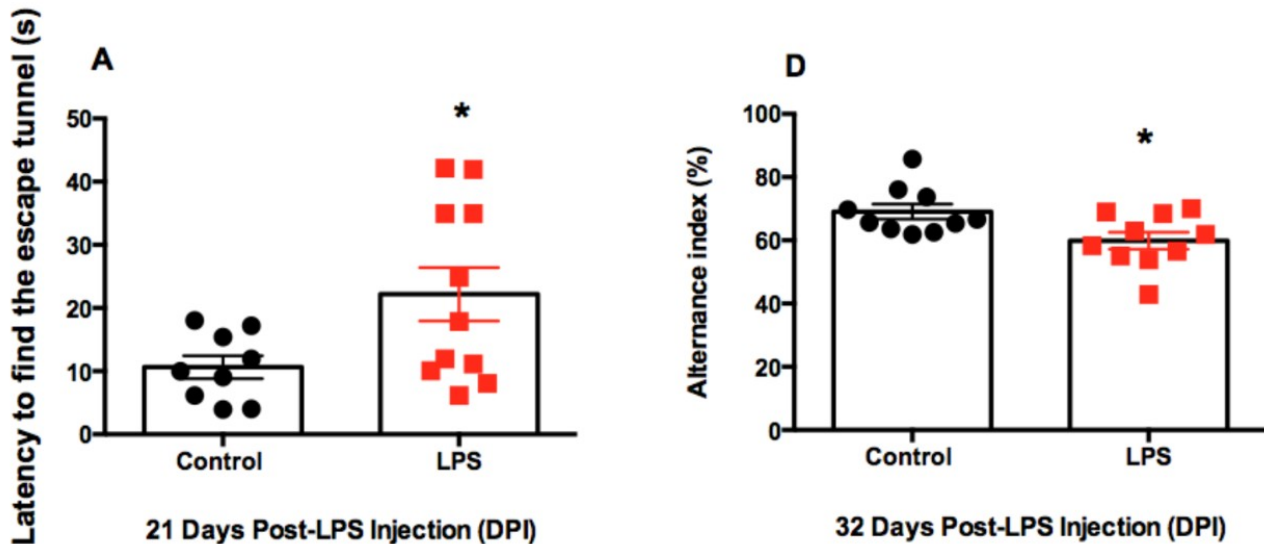


Gráfico 3 - Efeitos do LPS no desempenho do Teste de Labirinto de Barnes e Teste do Labirinto em Y. (A) Latência aumentada para encontrar a rota de fuga (efeito principal da condição de tratamento, $P < 0,0321$) (D) Índice de alternância entre os braços do labirinto em Y diminuído (efeito principal da condição de tratamento, $P < 0,0186$). (N= 9-11).

7.3 EXPRESSÃO AUMENTADA DE A-SYN NO HIPOCAMPO

Foram medidas as expressões de α -syn em três regiões do SNC (hipocampo, substância negra e estriado) para avaliar o potencial do modelo de alterar a expressão da proteína (Gráfico 4A-C). Observamos que próximo à indução (4dpi), o hipocampo apresentou um aumento da expressão de α -syn, condizente com alterações comportamentais associadas a essa região posteriormente, com 23 dpi. Não foram observadas alterações nas expressões de α -syn no 23° dpi (Gráfico 5A-C).

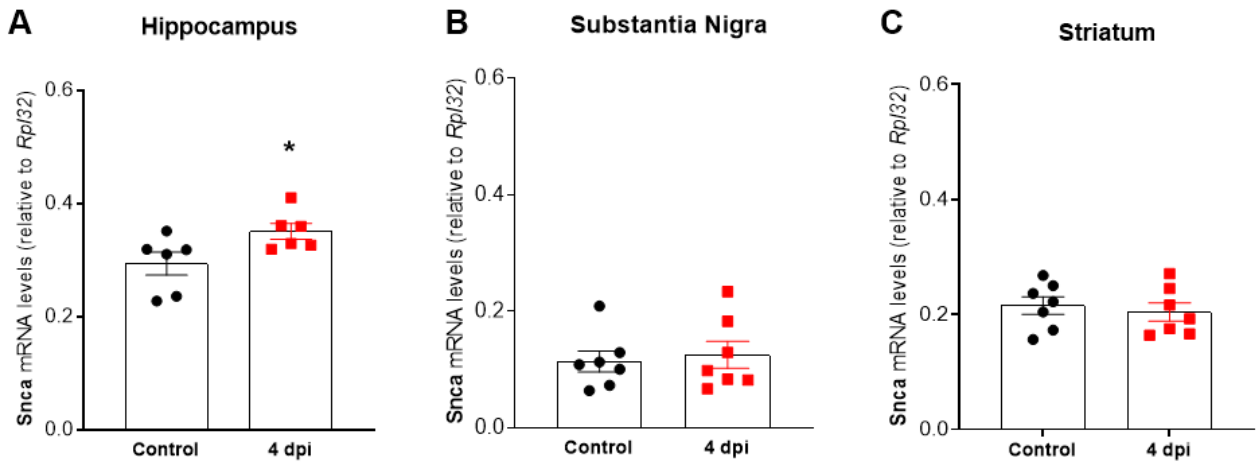


Gráfico 4 - Efeitos do LPS na expressão de α -syn-total no hipocampo, substância negra e estriado no 4º dpi. (A-C) análise por RTq-PCR das três regiões com $P < 0,0436$ no Hipocampo. (N= 6-7).

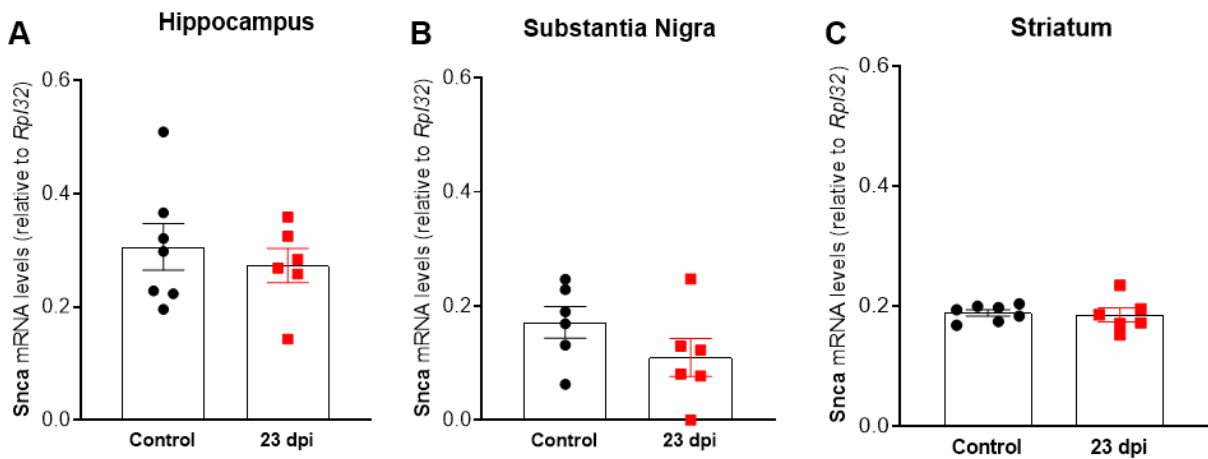


Gráfico 5 - Expressão de mRNA do gene SNCA no hipocampo, substância negra e estriado com 23 dpi. (A-C) Não foram encontradas alterações para esse time point. (N= 6-7).

7.4 MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS EM REGIÕES CEREBRAIS

7.4.1 No 4º dia após a indução

A quantificação das citocinas por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) revelou uma redução significativa da fractalquina no hipocampo dos animais tratados com LPS no 4º dpi (Gráfico 6A) em comparação ao grupo controle. Os níveis de IL-1 β também se reduziram no 4º dpi no estriado (Gráfico 7B). Importante ressaltar que não foram identificadas diferenças

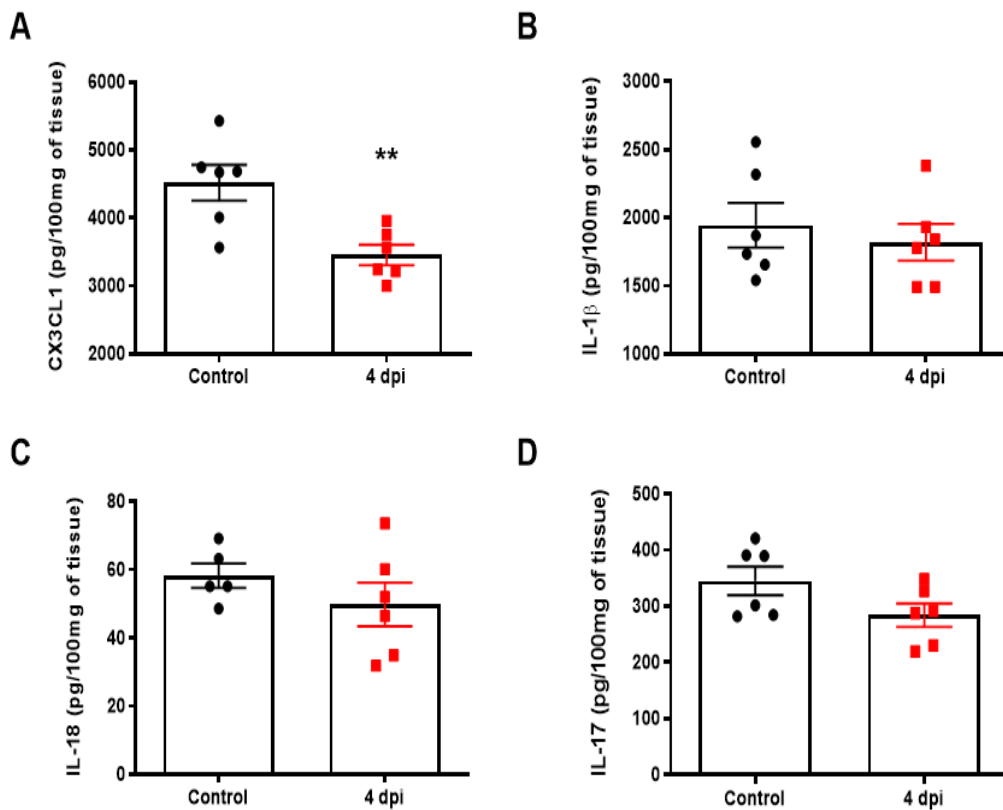


Gráfico 6 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Hipocampo no 4º dpi. A Diminuição de CX3CL1 hipocampal (efeito principal da condição de tratamento, $P < 0,0370$). (B-D) Não foram identificadas diferenças significativas na concentração de outras citocinas entre os grupos. (N= 5-7).

estatisticamente significativas na substância negra nesse momento (Gráfico 8A-D), nem para as outras citocinas no hipocampo e estriado.

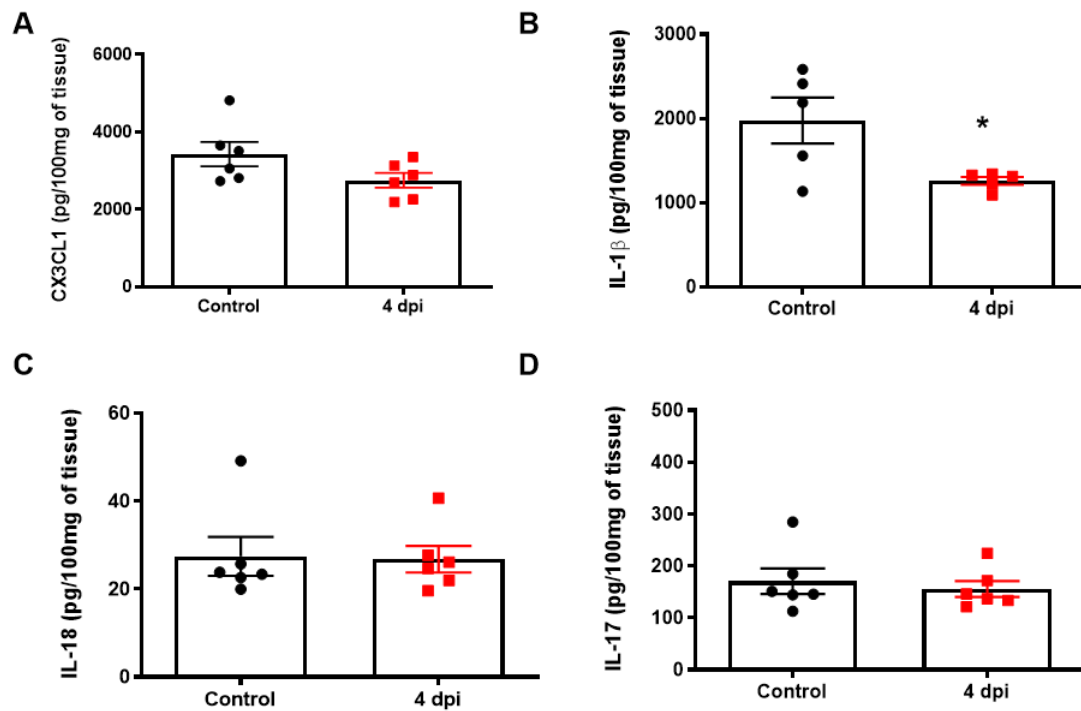


Gráfico 7 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Estriado no 4º dpi. (B) Diminuição de IL-1 β estriatal (efeito principal da condição de tratamento, $P < 0,0319$). (A, C e D) Não foram identificadas diferenças significativas na produção de outras citocinas entre os grupos. (N= 5-6).

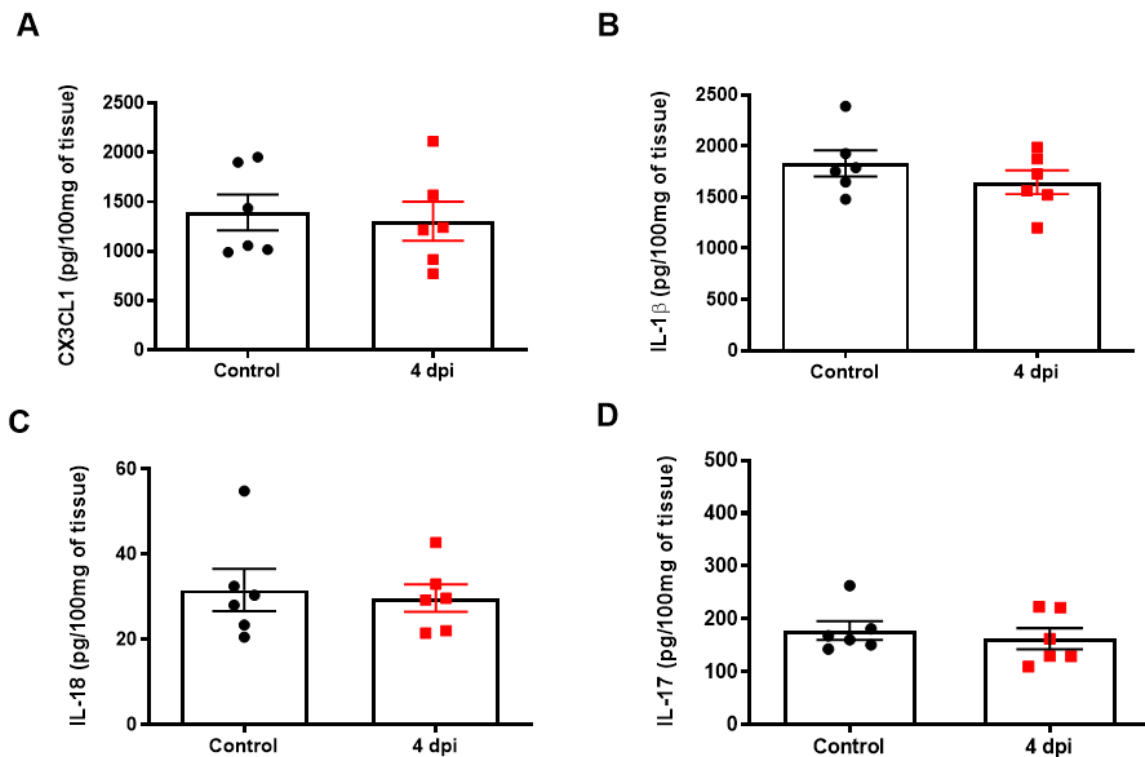


Gráfico 8 - Perfil das dosagens de Citocinas e Quimiocinas na Substância Negra com 4 dpi. (A-D) Não foram identificadas diferenças significativas na concentração das citocinas. (N= 6).

7.4.2 No 23º dia após indução

Os níveis de CX3CL1 mantiveram-se reduzidos no 23º dpi. Além disso, houve também queda da concentração da citocina pró-inflamatória IL-18, ambas no hipocampo (Gráfico 9A e C). Para esse mesmo momento (23º dpi), podemos observar também uma diminuição nos níveis de IL-1 β no estriado (Gráfico 10B) em resposta à administração de LPS. Já na substância negra houve a diminuição apenas dos níveis de CX3CL1 (Gráfico 11A).

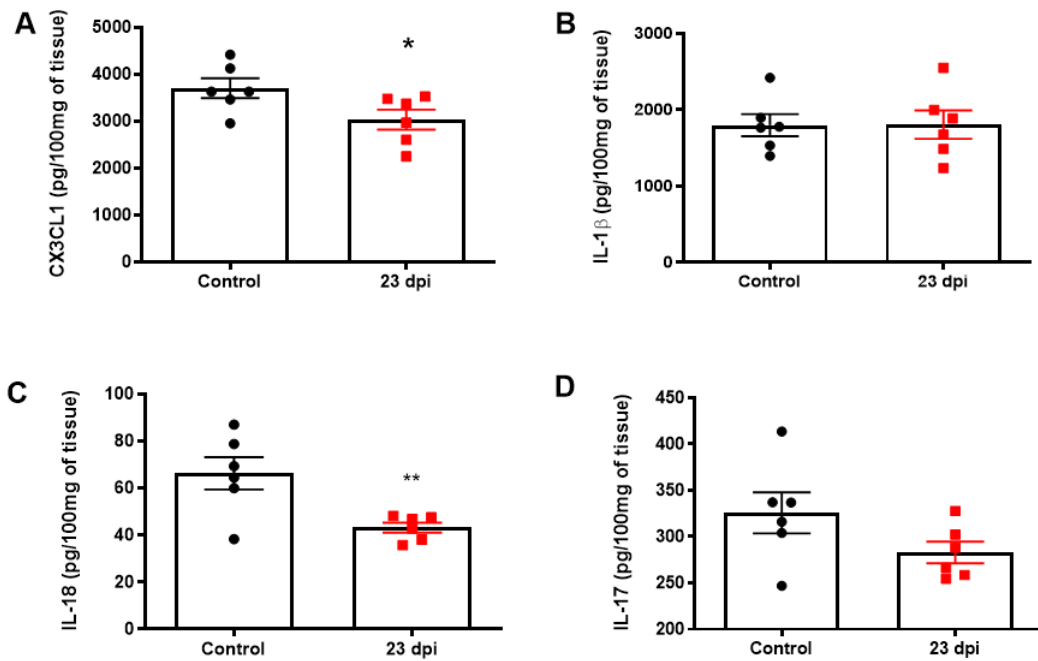


Gráfico 9 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Hipocampo no 23º dpi. (A e C) Observa-se a diminuição da Fractalquina ($P < 0,0484$) e IL-18 ($P < 0,0094$) hipocampal. (B e D) As concentrações de IL-1 β e IL-17 não foram alteradas. (N= 6).

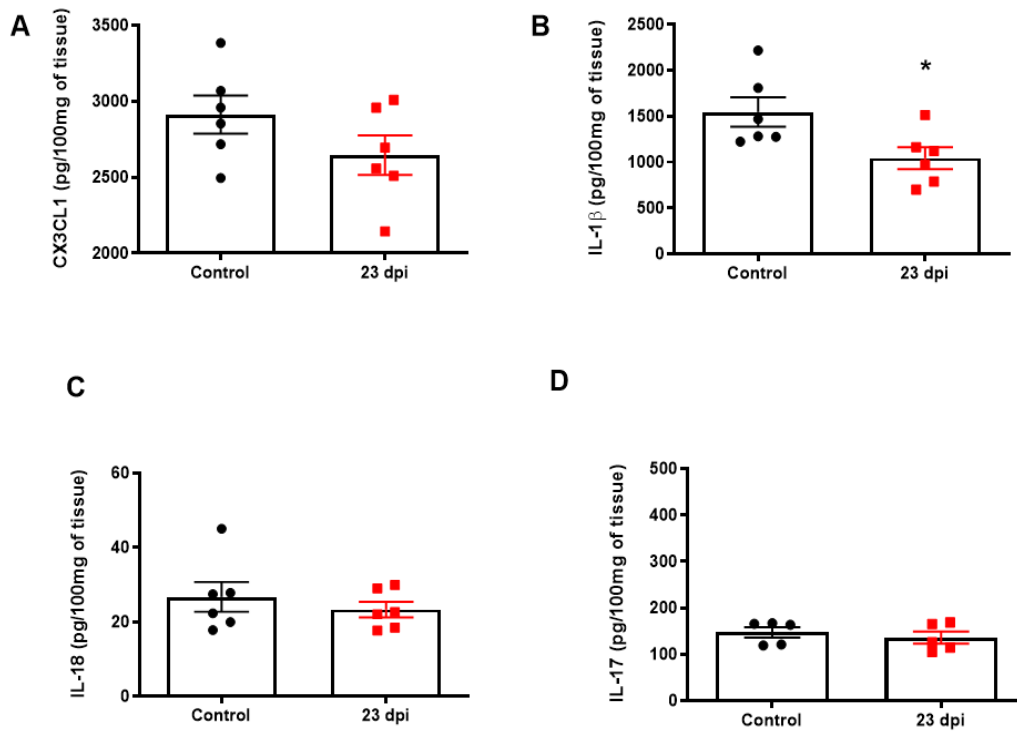


Gráfico 10 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas no Estriado no 23º dpi. (A) A concentração de CCX3CL1 não foi alterada. (B) Observa-se a diminuição de IL-1 β ($P < 0,0307$) estriatal. (C e D) As concentrações de IL-18 e IL-17 não foram alteradas. (N= 4-6).

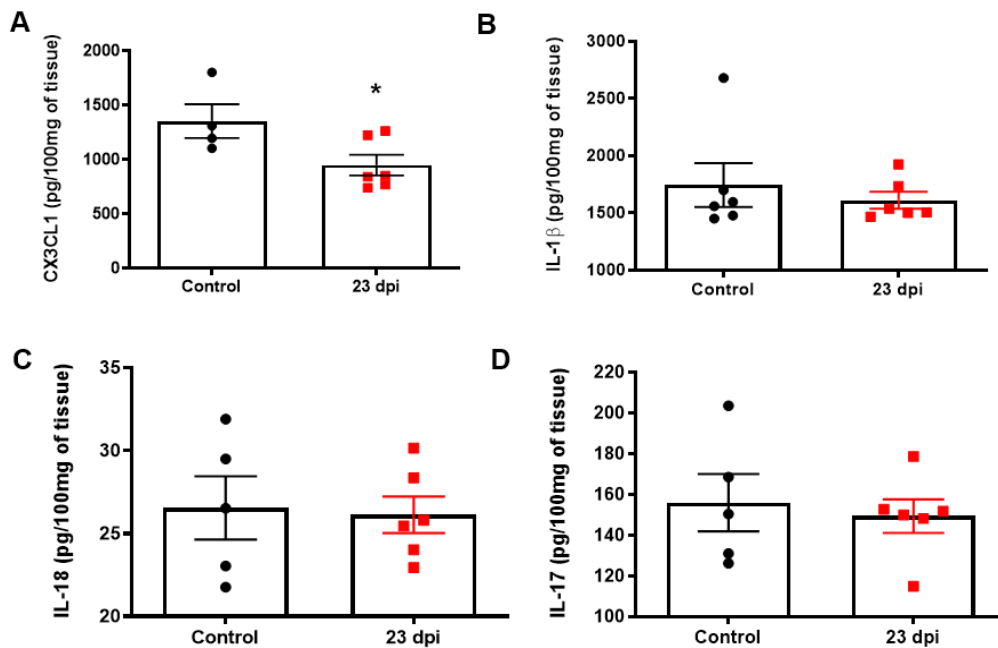


Gráfico 11 - Perfil das Dosagens de Citocinas e Quimiocinas na Substância Negra no 23º dpi.. (A) Diminuição de CX3CL1 na SN induzida pelo tratamento com LPS ($P < 0,0453$). (B-D) Não foram identificadas diferenças significativas na concentração das outras citocinas. (N= 4-6).

7.5 LPS ALTERA A EXPRESSÃO DO RECEPTOR CX3CR1 E CITOCINAS

7.5.1 No 4º dia após a indução

A análise por RT-qPCR revelou um aumento da expressão do receptor de fractalquina (CX3CR1) (Gráfico 12A) no hipocampo no 4º dpi nos animais tratados com LPS. Além disso, também houve um aumento nos níveis de mRNA de IL-18 (Gráfico 12C). Não foram identificadas diferenças na expressão de IL-1 β . Não observamos alterações no estriado e na substância negra (Gráficos 13A-C e 14A-C).

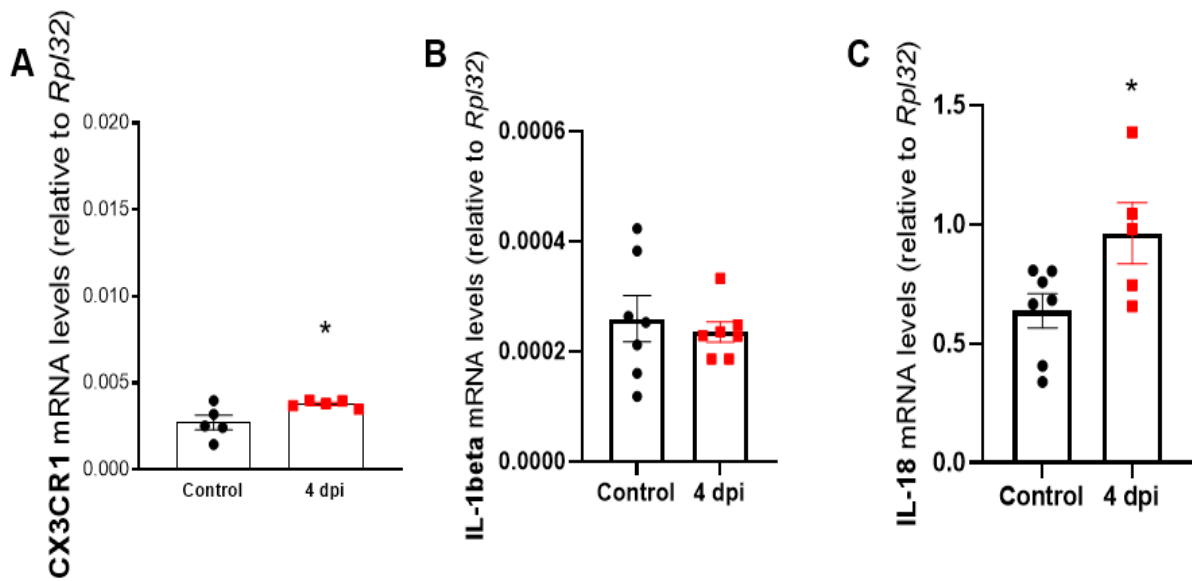


Gráfico 12 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo no 4º dpi. (A) Aumento da concentração de mRNA de CX3CR1 ($P < 0,0370$). (B) Não houve alteração na concentração de mRNA de IL-1 β no 4º dpi. (C) Aumento da concentração de mRNA de IL-18 ($P < 0,0383$). (N= 5-7).

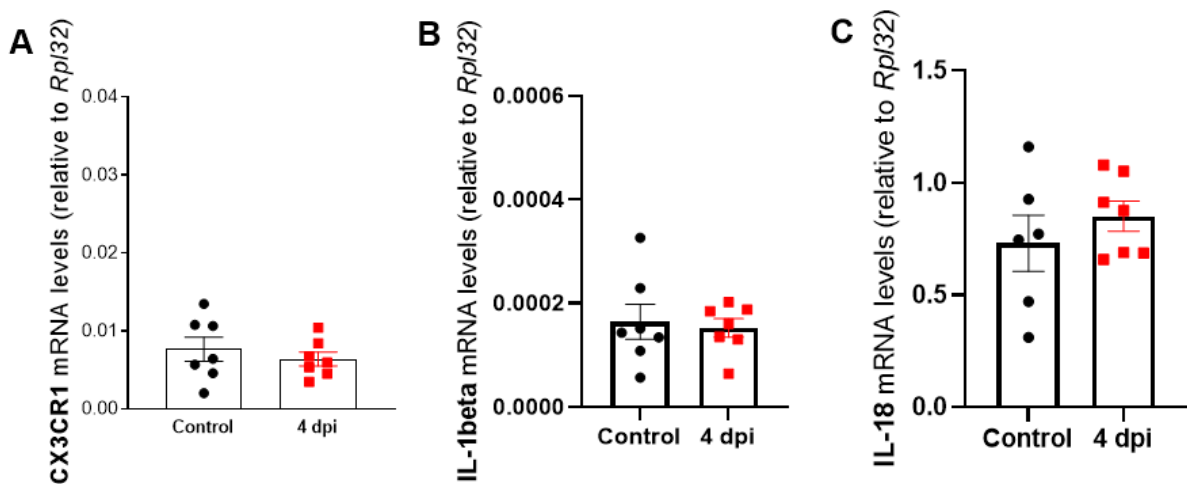


Gráfico 13 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no estriado com 4 dpi. (N= 6-7).

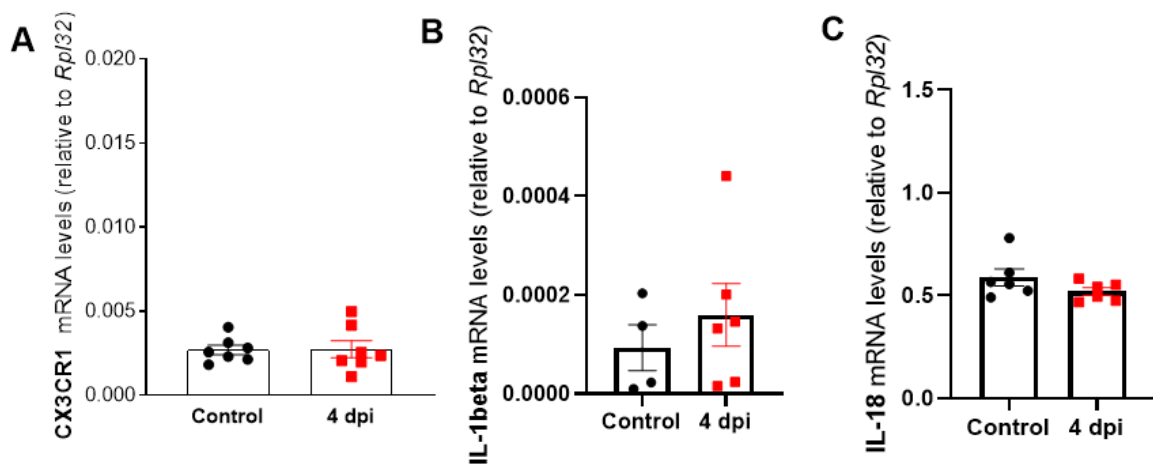


Gráfico 14 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias na substância negra com 4 dpi. (N= 4-7).

7.5.2 No 23º dia após indução

Houve também um aumento da expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1beta e IL-18 no hipocampo no 23º dpi, sem alteração na expressão do receptor de fractalquina (Gráfico 15A-C).

Além disso, também foi encontrada uma diminuição nos níveis de mRNA de CX3CR1 e IL-1 β no estriado com 23 dpi (Gráfico 16A e B), bem como uma diminuição da expressão de CX3CR1 na substância negra para esse mesmo período de tempo (Gráfico 17A).

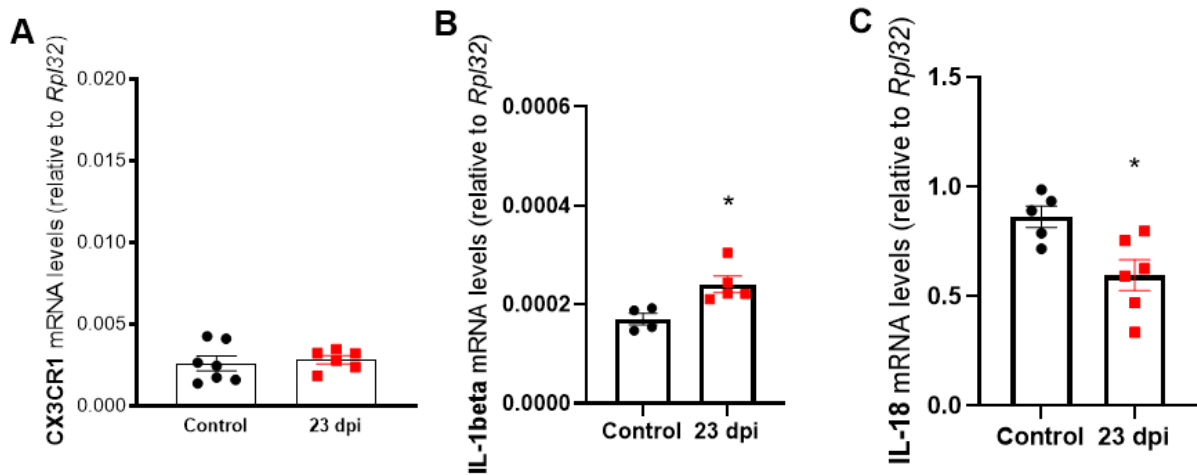


Gráfico 15 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no hipocampo no 23º dpi. (A) Não houve alteração na concentração de mRNA de CX3CR1. (B) Aumento da concentração de mRNA de IL-1 β ($P < 0,0148$). (C) Houve uma diminuição da concentração de mRNA de IL-18 ($P < 0,0156$). (N= 5-7).

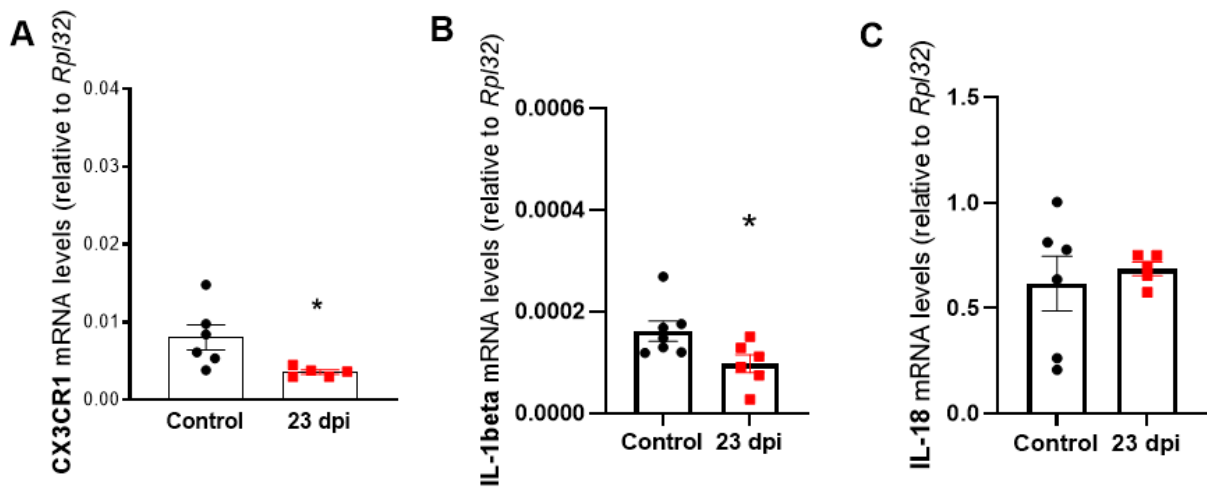


Gráfico 16 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias no estriado no 23º dpi. (A) Diminuição da concentração de mRNA de CX3CR1 ($P < 0,0342$). (B) Houve uma diminuição da concentração de mRNA de IL-1 β ($P < 0,0376$). (C) Não houve alteração na concentração de mRNA de IL-18. (N= 4-7).

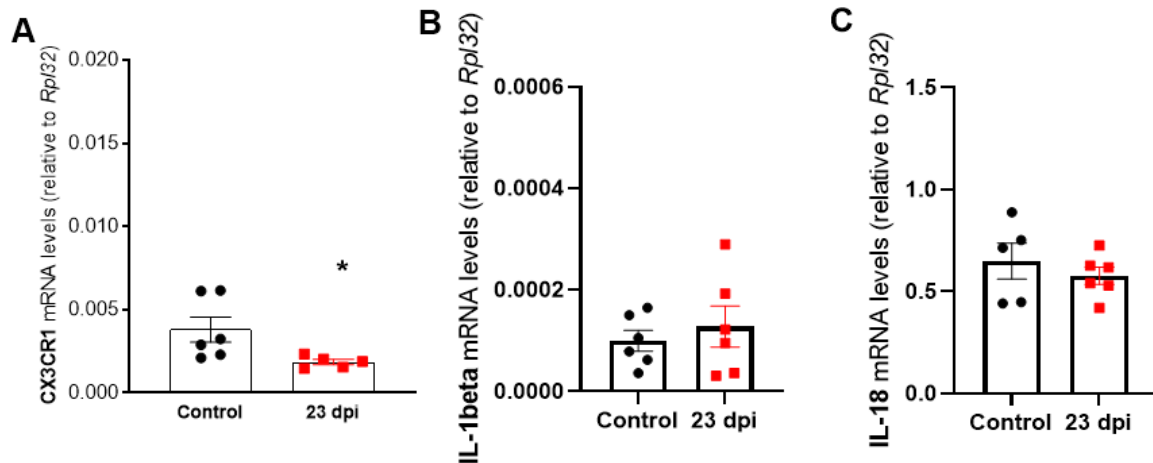


Gráfico 17 - Concentração dos níveis de mRNA de CX3CR1 e citocinas pró-inflamatórias na substância negra no 23º dpi. (A) Diminuição da concentração de mRNA de CX3CR1 ($P < 0,0473$). (B) Não houve alteração na concentração de mRNA de IL-1 β . (C) Não houve alteração na concentração de mRNA de IL-18. (N= 5-6).

7.6 REDUÇÃO DOS FATORES NEUROTÓPICOS EM REGIÕES CEREBRAIS

7.6.1 No 4º dia após a indução

A indução com LPS levou à diminuição dos níveis de NGF hipocampal no 4º dia pós-indução (Gráfico 18B). Já no estriado com 4 dpi, houve um aumento dos níveis de NGF (Gráfico 19B). Não houve alterações dos níveis de BDNF e GDNF nesse *time point* para ambas regiões. Não observamos alterações na substância negra (Gráfico 20A-C).

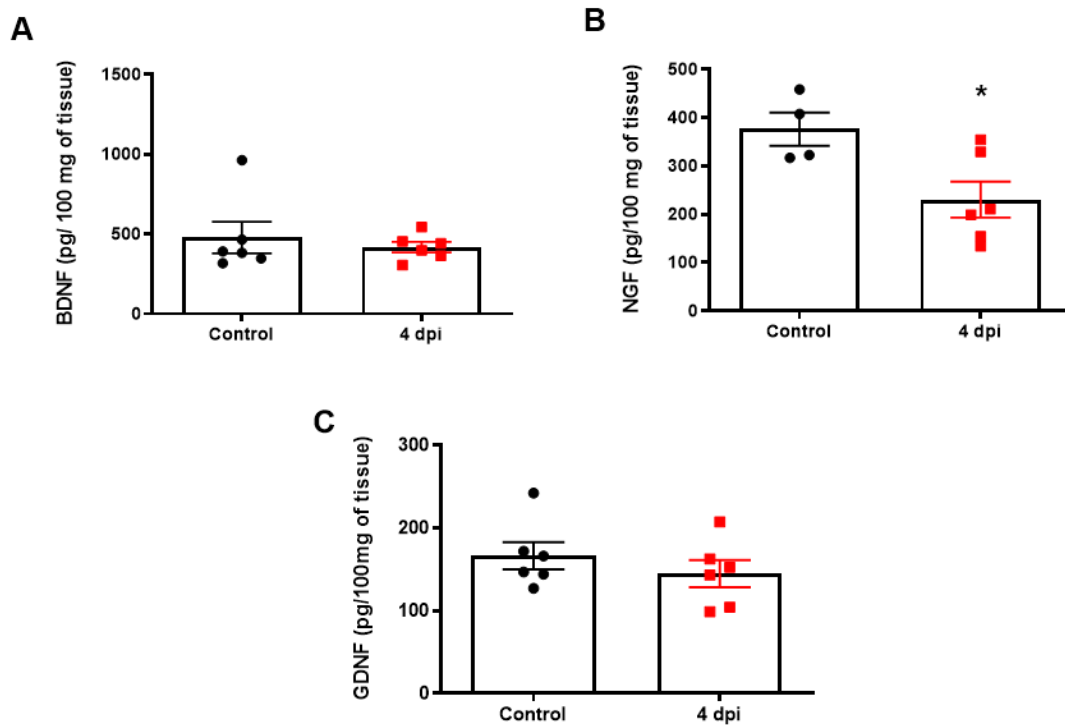


Gráfico 18 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Hipocampo no 4º dpi. (B) Diminuição dos níveis de NGF hipocampal induzida pelo tratamento com LPS ($P < 0,0266$). (A e C) Não foram identificadas alterações significativas na concentração de outros fatores neurotróficos. (N= 4-6).

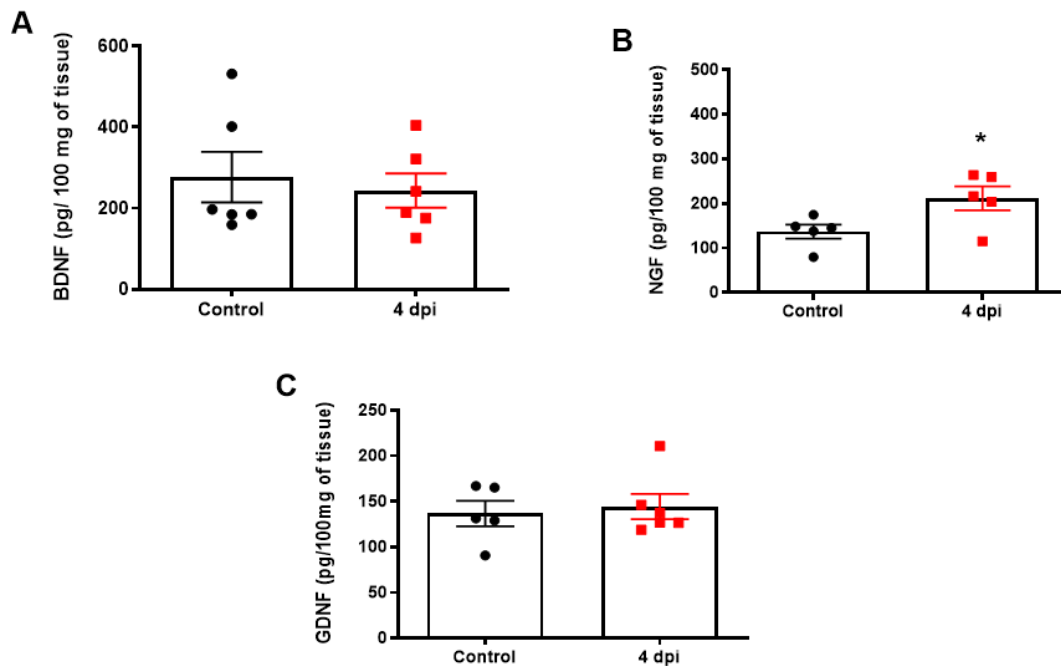


Gráfico 19 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Estriado no 4º dpi. (B) Aumento dos níveis de NGF estriatal induzida pelo tratamento com LPS ($P < 0,0433$). (A e C) Não foram identificadas alterações significativas na concentração de outros fatores neurotróficos. (N= 4-6).

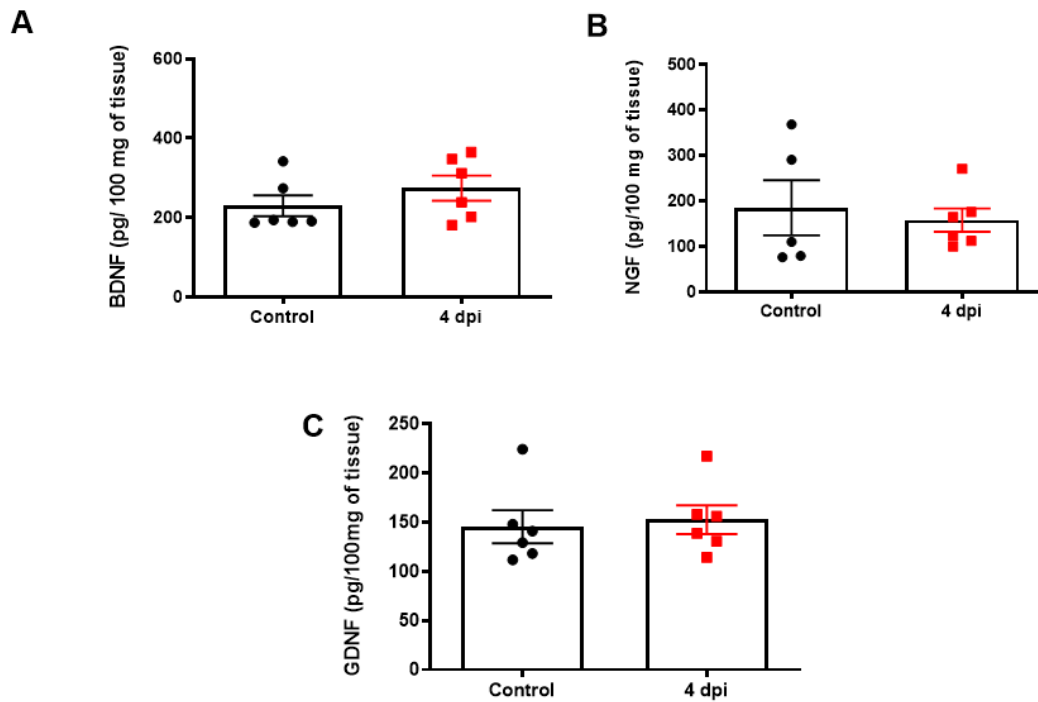


Gráfico 20 - Perfil das dosagens de Fatores Neurotróficos na Substância Negra com 4 dpi. (A-C) Não foram encontradas alterações nas concentrações de fatores neurotróficos. (N= 5-6).

7.6.2 No 23º dia após a indução

Os níveis de NGF mantiveram-se reduzidos no 23º dpi no hipocampo (Gráfico 21B). Além disso, também houve queda da concentração de BDNF hipocampal (Gráfico 21A) neste *time point*. Não houve alterações nos níveis de GDNF (Fator de Crescimento de Linhagem Glial) em relação ao grupo controle (Gráfico 21C).

O NGF foi o único fator neurotrófico que apresentou redução em seus níveis de concentração no estriado com 23 dpi (Gráfico 22B). Com 23 dpi, a substância negra apresentou diminuição da concentração de NGF e aumento de GDNF (Gráfico 23B e C).

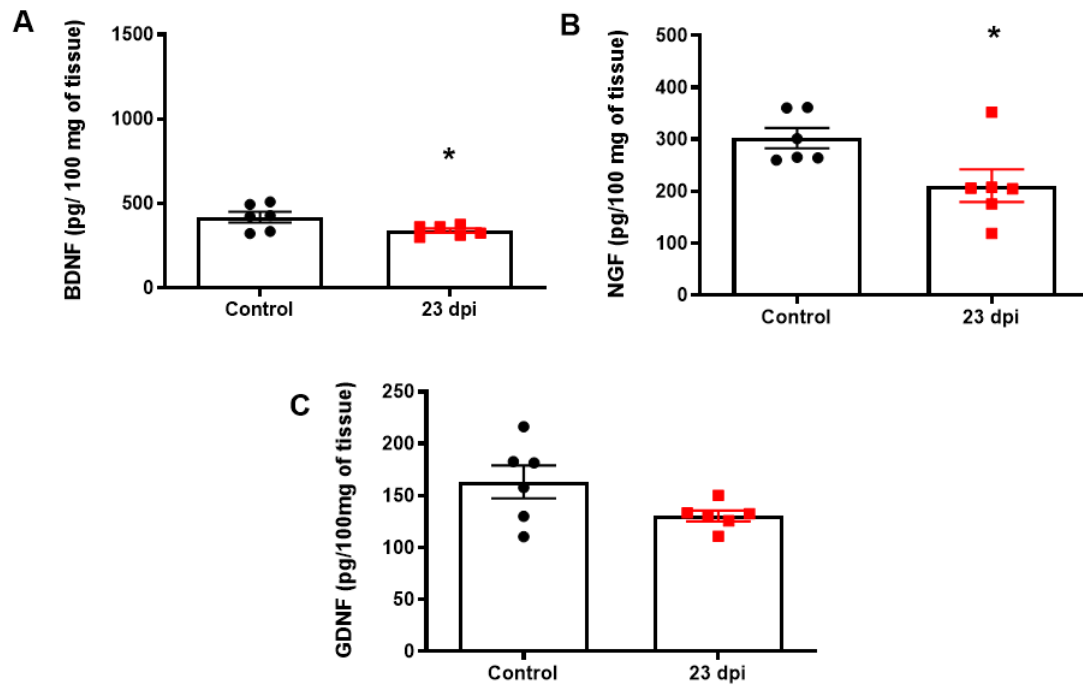


Gráfico 21 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Hipocampo no 23º dpi. (A e B) Observa-se diminuição da concentração de BDNF e NGF hipocampal ($P < 0,0447$ e $P < 0,0260$, respectivamente). (C) A concentração de GDNF não foi alterada na região para esse time-point. (N= 6).

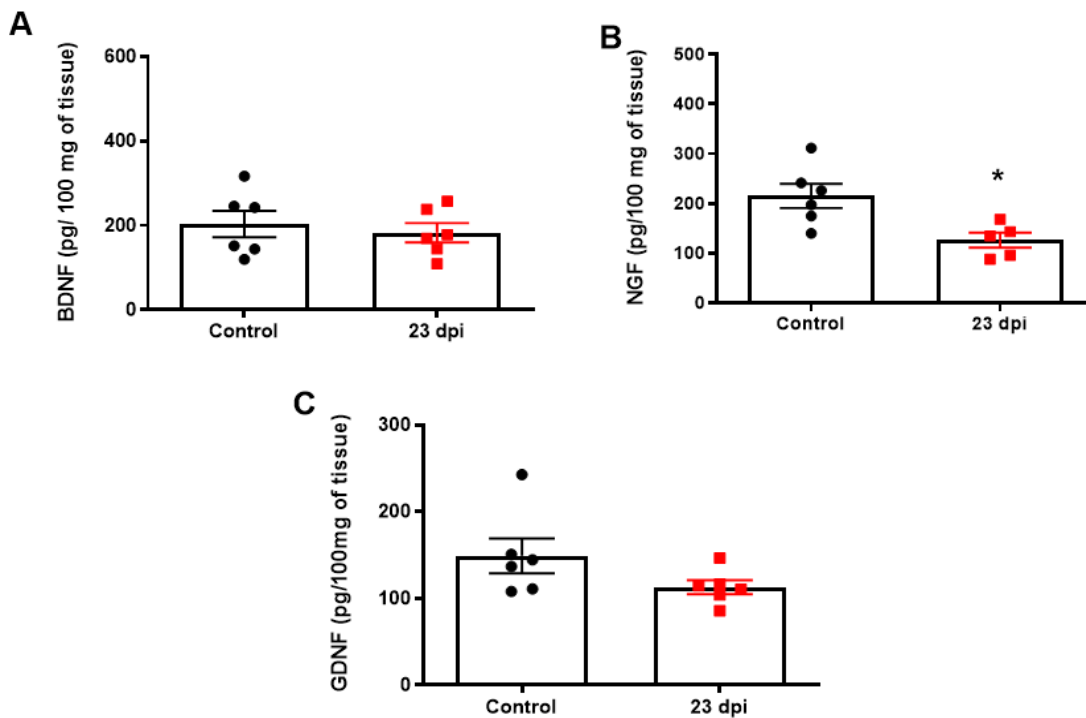


Gráfico 22 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos no Estriado no 23º dpi. (A e C) As concentrações de BDNF e GDNF não foram alteradas pelo LPS. B Observa-se uma diminuição de NGF estriatal ($P < 0,0159$). (N= 5-6).

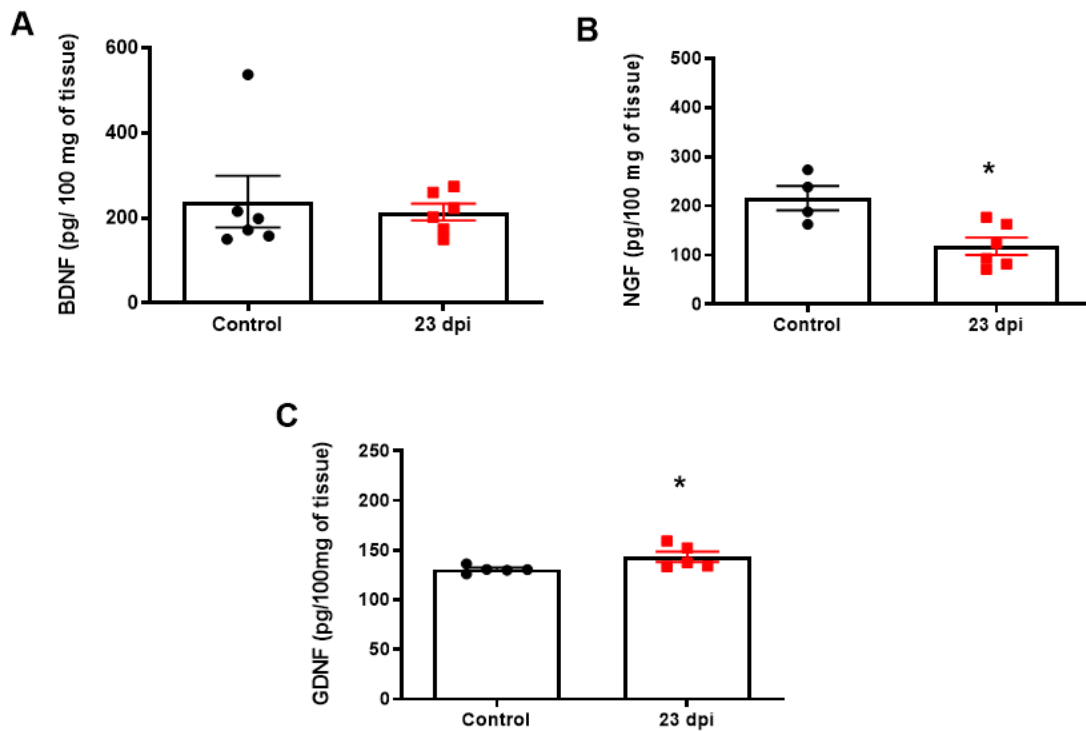


Gráfico 23 - Perfil das Dosagens de Fatores Neurotróficos na Substância Negra no 23º dpi. (A) A concentração de BDNF não foi alterada pelo LPS. (B) Diminuição de NGF ($P < 0,0114$). (C) Aumento na concentração de GDNF na região ($P < 0,0496$). (N= 4-6).

7.7 IMPACTO DO LPS NA VIA DO INFLAMASSOMA

7.7.1 No 4º dia após a indução

A expressão de mRNA por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR) revelou alterações em componentes centrais associados à via do inflamassoma. No 4º dpi, houve um aumento da expressão hipocampal de Casp1 (Gráfico 24C), protease que integra a plataforma proteica proteossomal e converte as formas inativas pro-IL18 e pro-IL-1 β em suas formas ativadas. Não sendo encontradas diferenças no estriado e na substância negra para esses marcadores (Gráficos 25A-C e 26A-C).

O modelo também foi capaz de causar o aumento dos níveis de mRNA de P50 na Substância Negra, um intermediária da via do fator de transcrição nuclear NF- κ B, associado à ativação da primeira via de sinalização do inflamassoma (Gráfico 29A). Não encontramos alterações para esses alvos no hipocampo e estriado (Gráficos 27A e B e 28A e B).

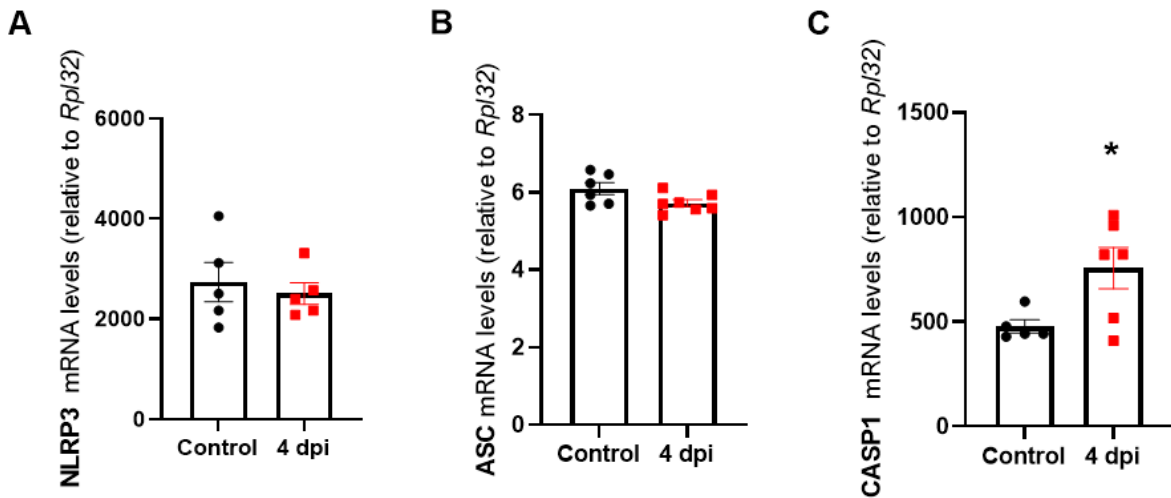


Gráfico 24 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes do Inflamassoma no Hipocampo no 4º dpi. (A-B) Não houve mudanças na concentração de mRNA de NLRP3 e ASC com 4 dpi. (C) Aumento da concentração de mRNA de CASP1 no 4º dpi ($P < 0,0348$). (N= 5-7).

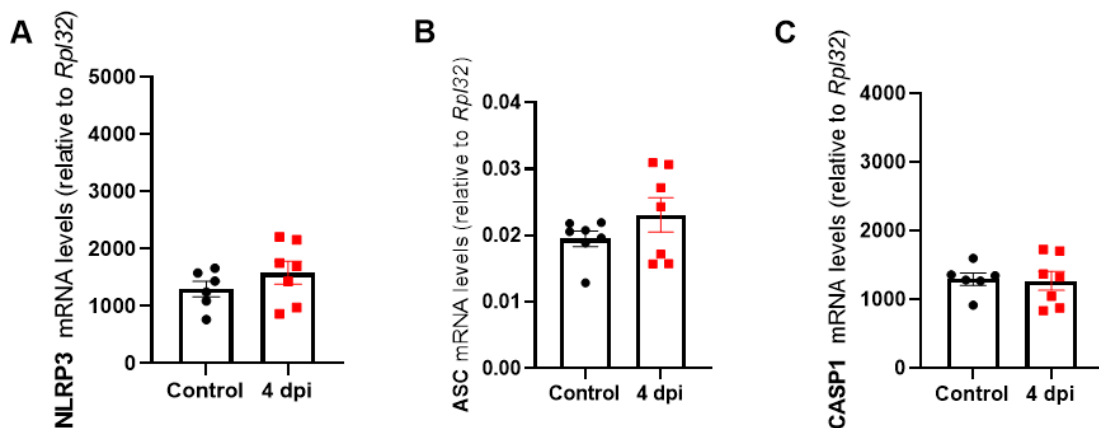


Gráfico 25 - Concentração dos níveis de mRNA de NLRP3, ASC e CASP1 no estriado com 4 dpi. (N= 5-7).

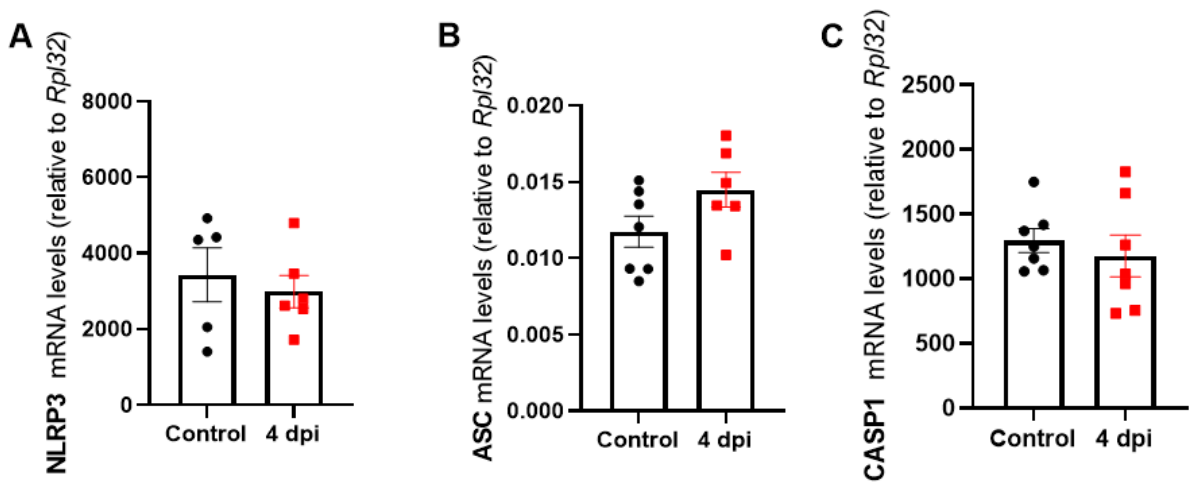


Gráfico 26 - Concentração dos níveis de mRNA de NLRP3, ASC e CASP1 na substância negra com 4 dpi. (N= 5-7).

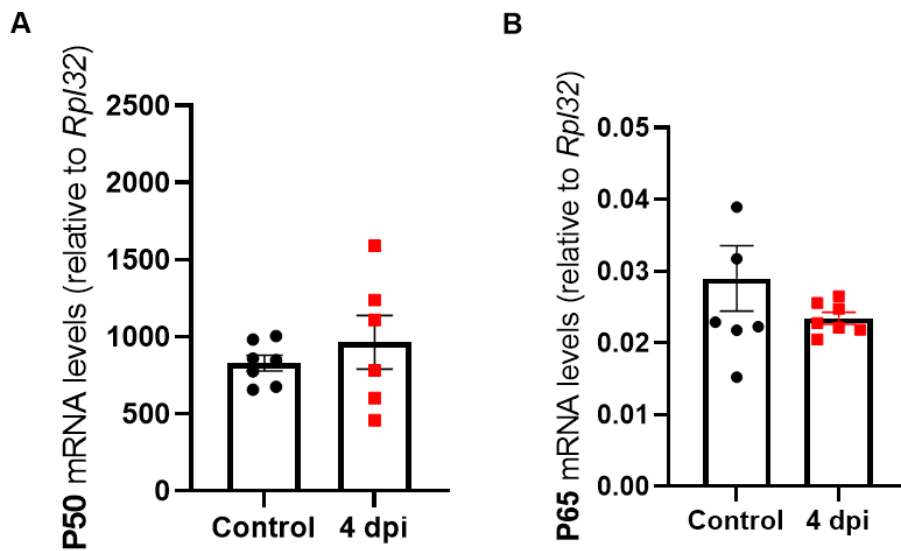


Gráfico 27 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 no hipocampo com 4 dpi. (N= 6-7).

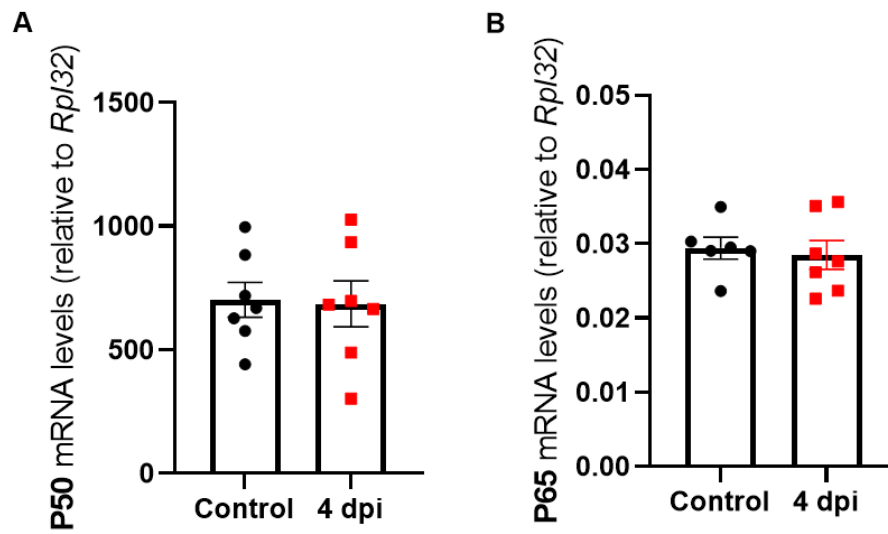


Gráfico 28 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 no estriado com 4 dpi. (N= 6-7).

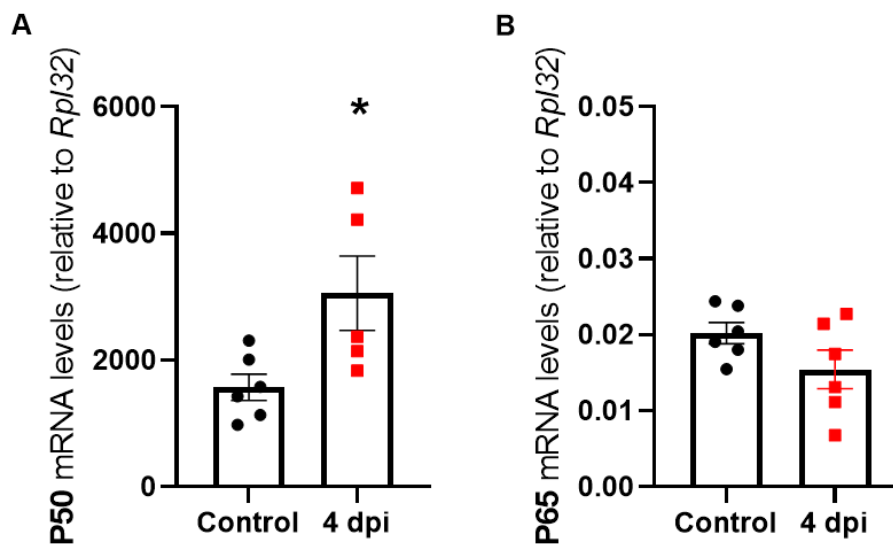


Gráfico 29 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 na Substância Negra no 4º dpi. (A) Aumento da concentração de mRNA da P50 no 4º dpi ($P < 0,0303$). (B) Não houve alteração na concentração de mRNA de P65. (N= 5-6).

7.7.2 No 23º dia após a indução

Com 23 dpi, encontramos alterações nos níveis de mRNA da via do inflamassoma no hipocampo e no estriado dos animais. No hipocampo, houve um aumento da concentração de mRNA do receptor NLRP3 (Gráfico 30A), não havendo diferença na expressão dos outros dois componentes da plataforma do inflamassoma (Gráfico 30B-C). No estriado, foi observado aumento na concentração de mRNA de CASP1 (Gráfico 31C). Não encontramos alterações na substância negra (Gráfico 32A-C).

Foi observada uma diminuição dos níveis de mRNA de P50 hipocampal e estriatal com 23 dpi (Gráficos 33A e 34A). Não observamos alterações na substância negra aqui também (Gráfico 35A e B).

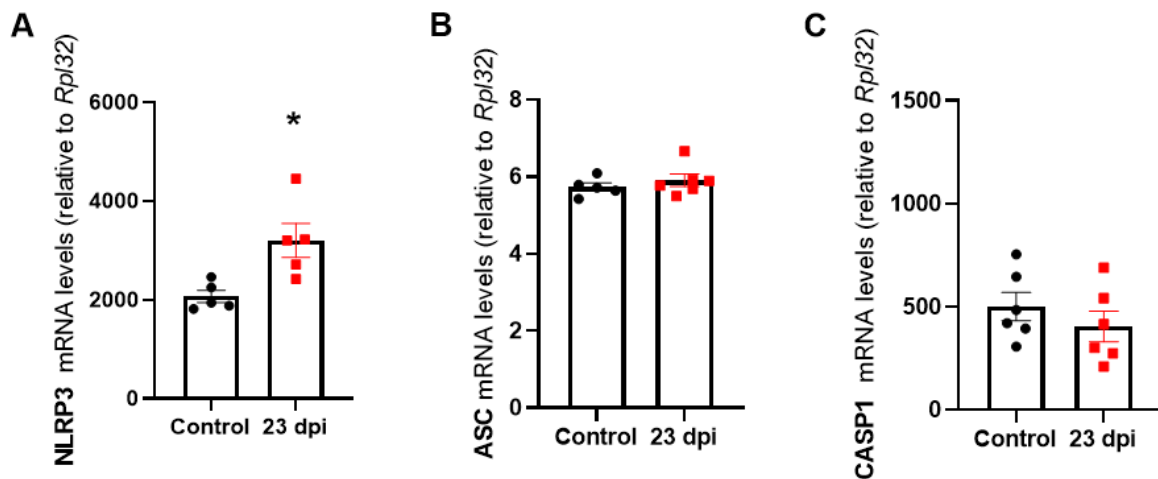


Gráfico 30 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes do Inflamassoma no Hipocampo no 23º dpi. (A) Aumento da concentração de mRNA de NLRP3 no 23º dpi ($P < 0,0152$). (B-C) Não houve mudanças na concentração de mRNA de ASC e CASP1 com 23 dpi. (N= 4-7).

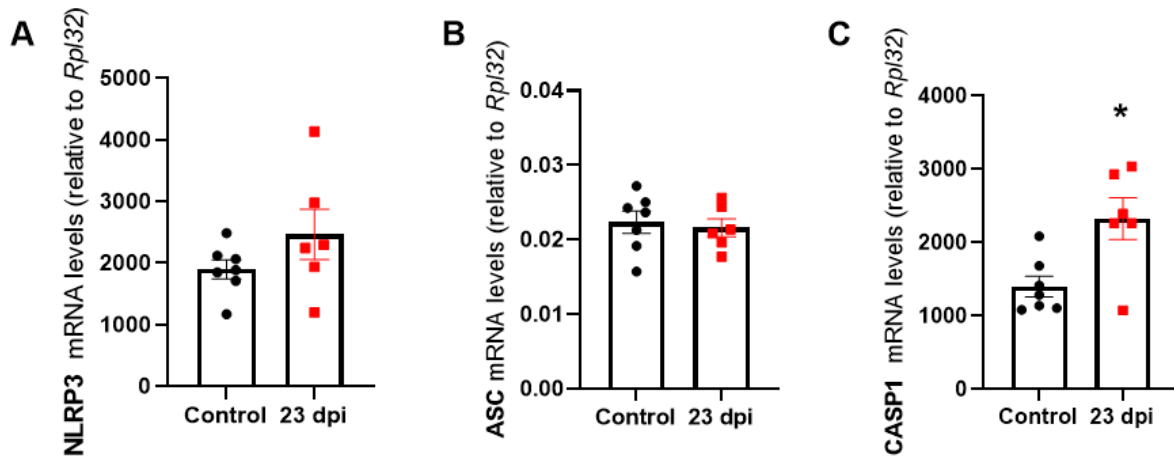


Gráfico 31 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes do Inflamassoma no Estriado no 23º dpi. (A-B) Não houveram mudanças nas concentrações de mRNA de NLRP3 e ASC. (C) Aumento da concentração de mRNA de CASP1 com 23 dpi. (N= 5-7).

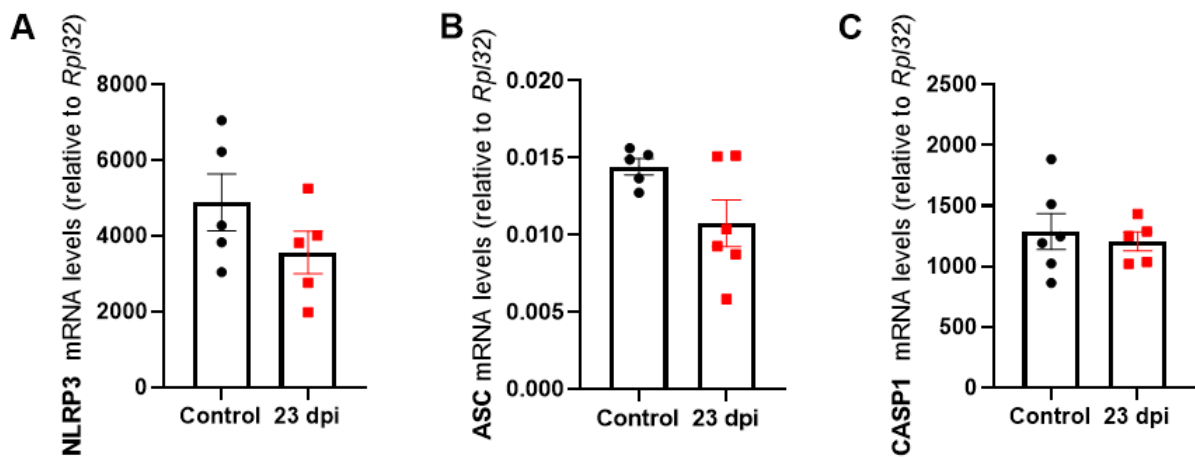


Gráfico 32 - Concentração dos níveis de mRNA de NLRP3, ASC e CASP1 na substância negra com 23 dpi. (N= 5-6).

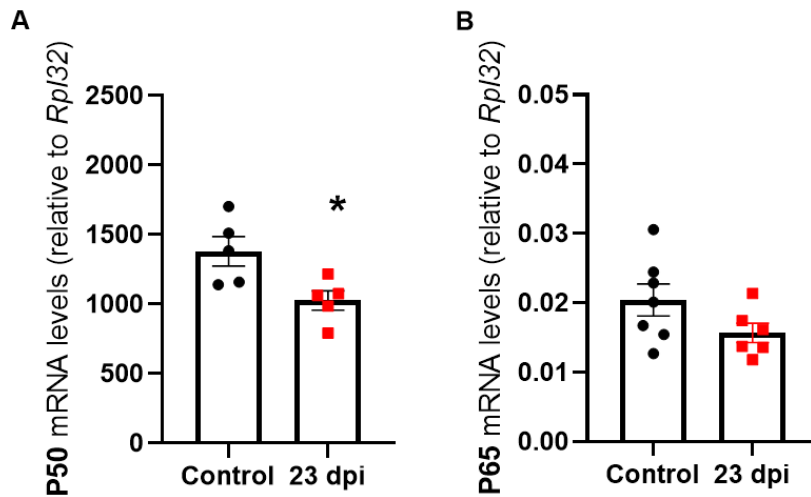


Gráfico 33 - Concentração dos níveis de mRNA do NF-kB no Hipocampo no 23º dpi. (A) Diminuição da concentração de mRNA da P50 no 23º dpi ($P < 0,0242$). (B) Não houve alteração na concentração de mRNA de P65. (N= 5-7).

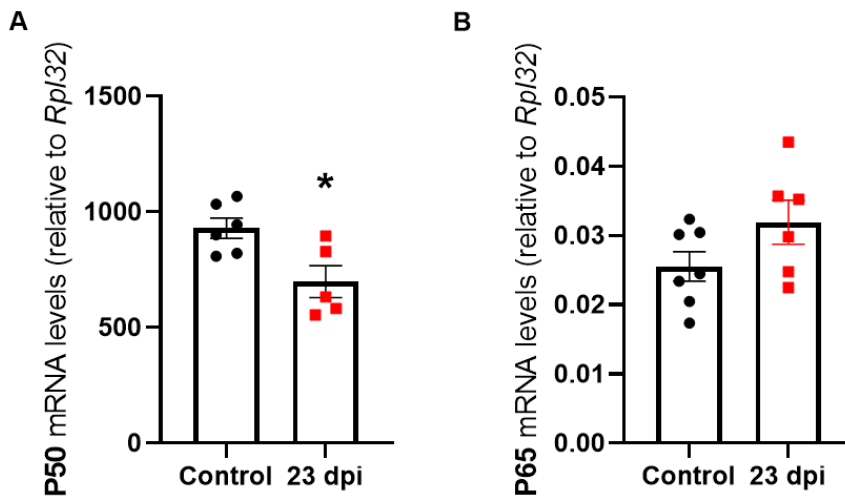


Gráfico 34 - Concentração dos níveis de mRNA do NF-kB no Estriado no 23º dpi. (A) Diminuição da concentração de mRNA da P50 no 23º dpi ($P < 0,0166$). (B) Não houve alteração na concentração de mRNA de P65. (N= 5-7).

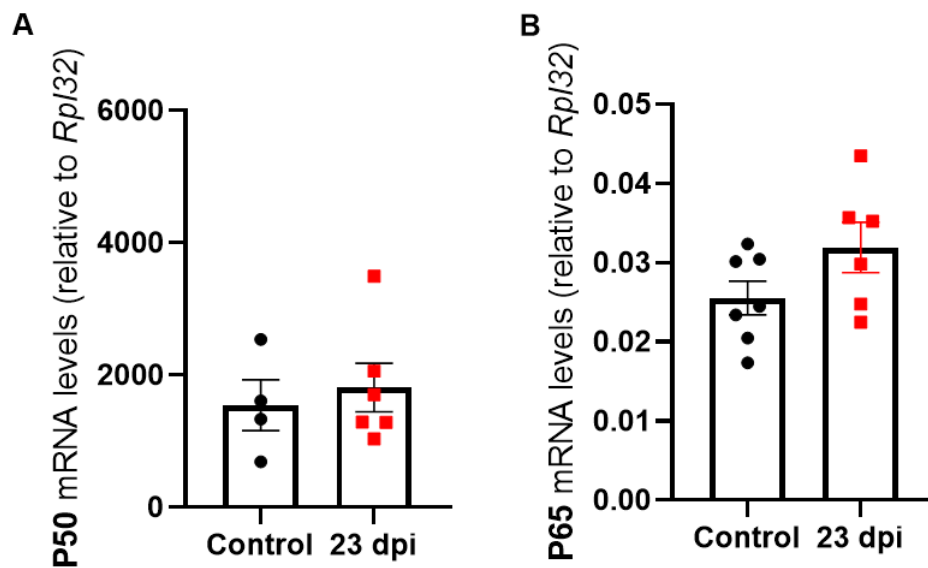


Gráfico 35 - Concentração dos níveis de mRNA de P50 e P65 na substância negra com 23 dpi. (N=4-7).

7.8 Impacto do LPS na Via das Chaperonas

7.8.1 No 4º dia após a indução

A expressão de mRNA por RT-qPCR revelou alterações em componentes centrais associados à via das Chaperonas. Houve um aumento da expressão de HSP70-1 (Gráfico 37B) na substância negra no 4º dpi, um heterodímero central desta via, e de STI1 (Gráfico 41B), uma co-chaperona importante na translocação de proteínas clientes da HSP70 para a HSP90.

Além disso, o LPS também causou alterações estriatais com 4 dpi, aumentando os níveis de mRNA de HSP40 e HSP70-3 (Gráficos 38A e C).

Não foram observadas alterações hipocâmpais para HSP40, HSP70-1 e HSP70-3 (Gráfico 36A-C), nem dos alvos HSP90 α e STI1 no hipocampo e estriado (Gráficos 39A e B 40A e B).

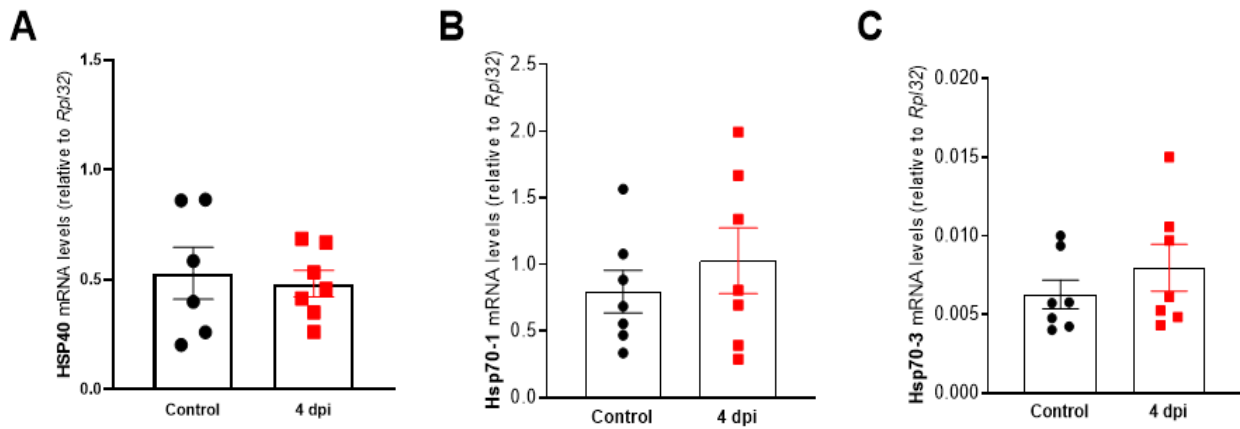


Gráfico 36 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP40, HSP70-1 e HSP70-3 no hipocampo com 4 dpi. (N= 6-7).

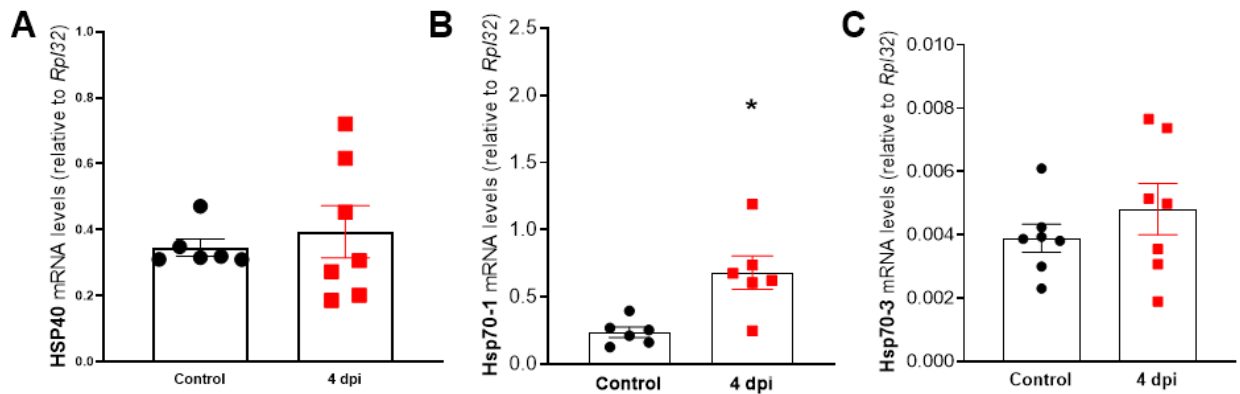


Gráfico 37 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas na Substância Negra no 4º dpi. (A) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP40. (B) Aumento nos níveis de mRNA da HSP70-1 ($P < 0,0152$). (C) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP70-3. (N= 6-7).

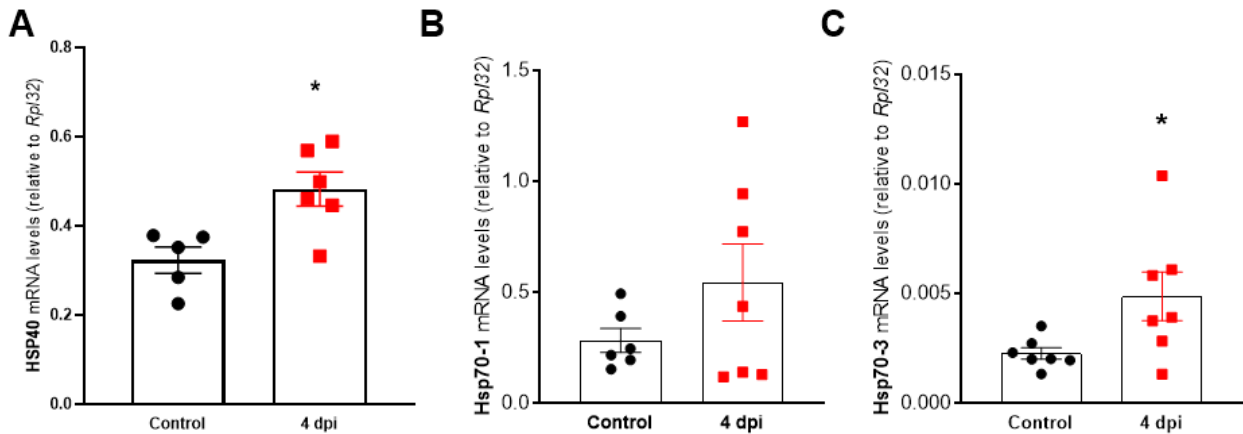


Gráfico 38 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas no Estriado com 4 dpi. (A) Aumento da concentração de mRNA de HSP40 ($P < 0,0109$). (B) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP70-1. (C) Aumento nos níveis de mRNA da HSP70-3 ($P < 0,0411$). (N= 5-7).

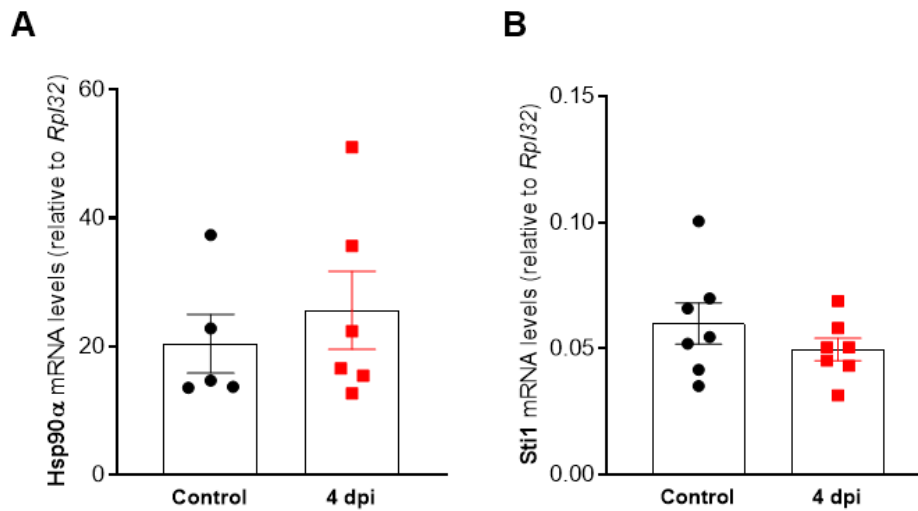


Gráfico 39 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no hipocampo com 4 dpi. (N= 5-7).

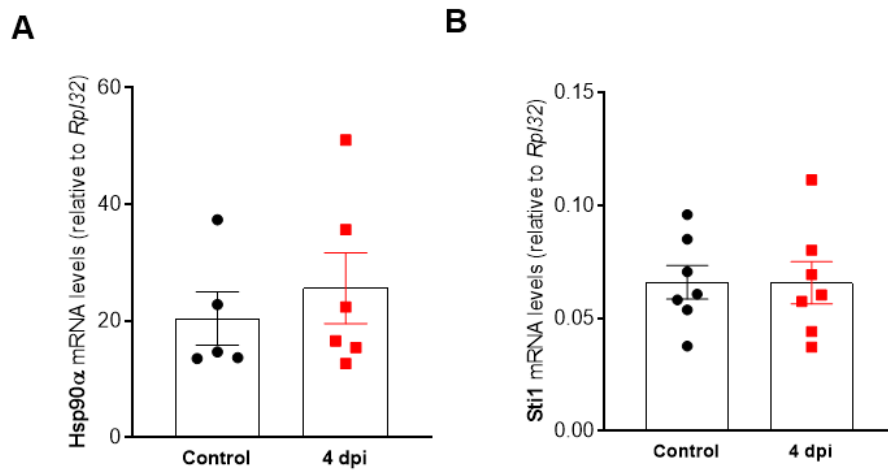


Gráfico 40 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no estriado com 4 dpi. (N= 5-7).

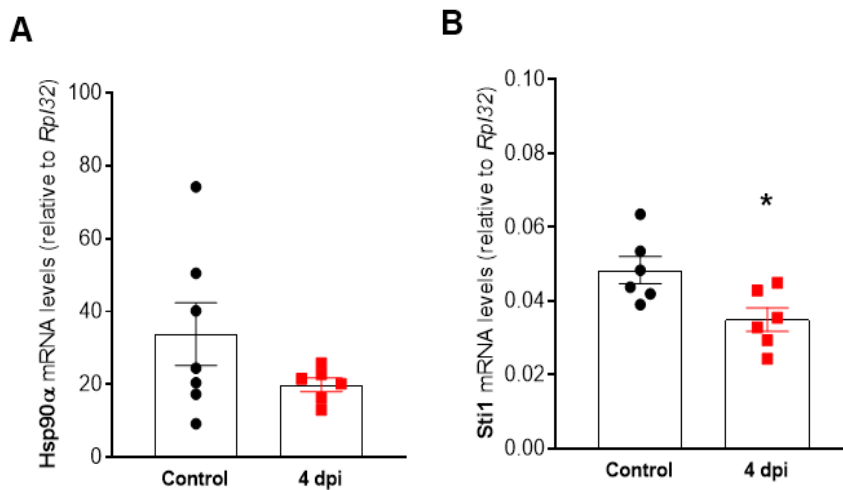


Gráfico 41 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas na Substância Negra no 4º dpi. (A) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP90α. (B) Diminuição nos níveis de mRNA de STI1 (P<0,0212). (N= 6-7).

7.8.2 No 23º dia após a indução

Com 23 dpi, houve alterações nos níveis de mRNA da via das chaperonas nas três regiões investigadas: hipocampo, estriado e substância negra. No hipocampo e na substância negra, houve aumento da concentração de mRNA das duas subunidades de HSP70 (Gráficos 42B e C; Gráficos 44B e C). No estriado foi observado um aumento dos níveis de mRNA de HSP70-1 (Gráficos 43B).

Não foram observadas alterações de HSP90 α e STI1 no hipocampo, estriado e substância negra (Gráficos 45A e B; 46A e B; 47A e B).

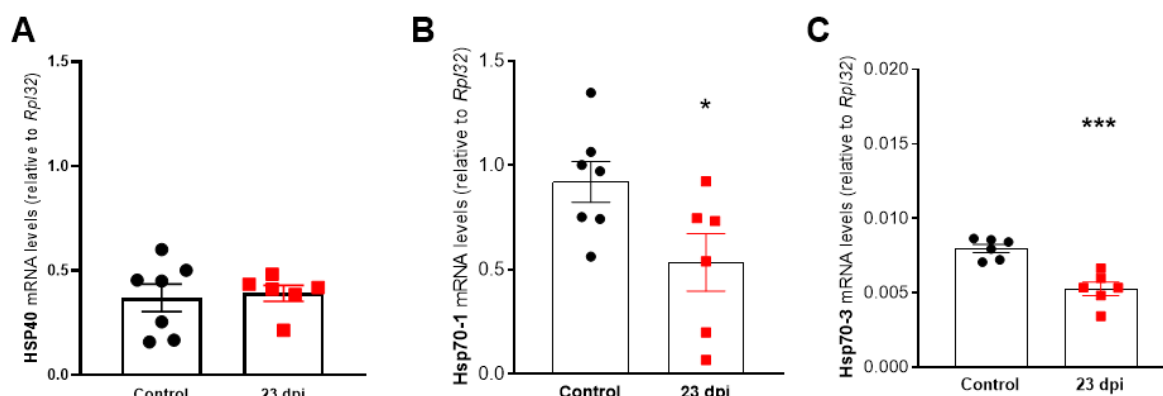


Gráfico 42 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas no Hipocampo com 23 dpi. (A) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP40. (B) Diminuição da concentração de mRNA de HSP70-1 ($P < 0,0392$). (C) Diminuição nos níveis de mRNA da HSP70-3 ($P < 0,0005$). (N= 6-7).

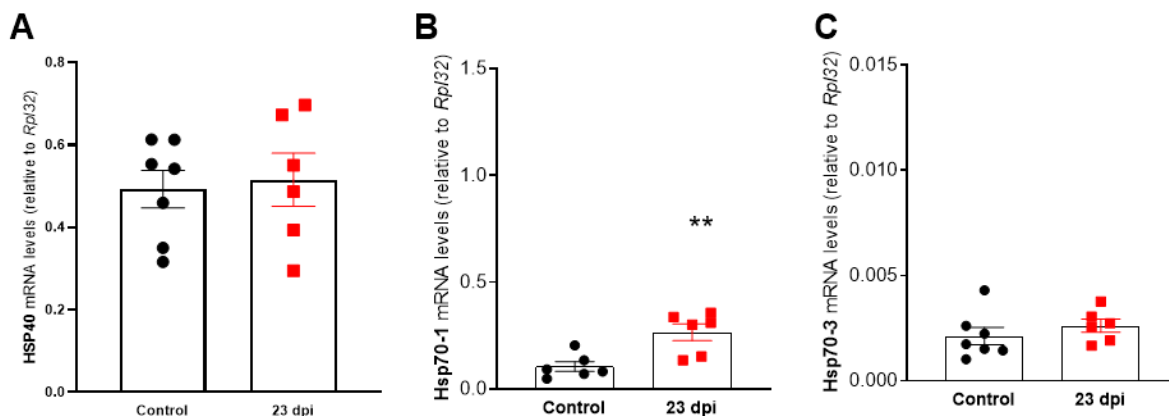


Gráfico 43 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas no Estriado com 23 dpi. (A) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP40. (B) Aumento nos níveis de mRNA da HSP70-1 ($P < 0,0057$). (C) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP70-3 (N= 6-7).

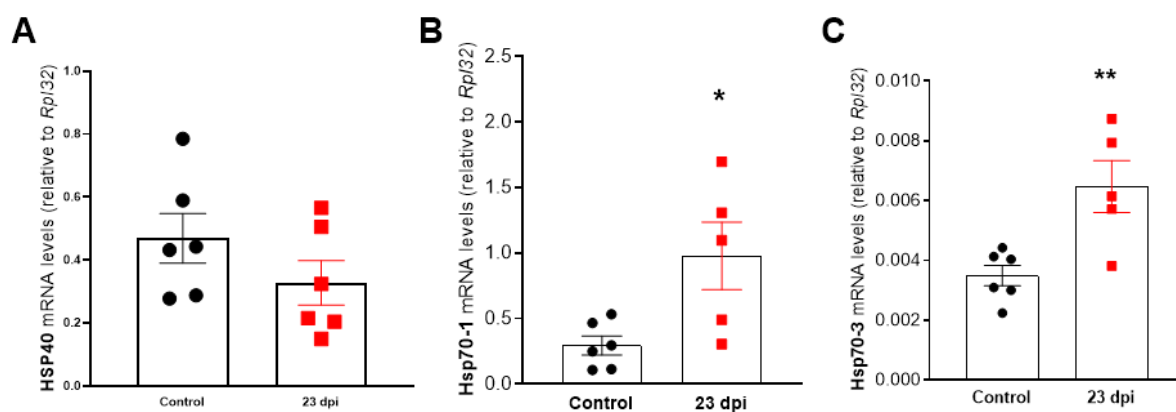


Gráfico 44 - Concentração dos níveis de mRNA dos componentes da via das Chaperonas na Substância Negra no 23º dpi. (A) Não houve alteração na concentração de mRNA de HSP40. (B) Aumento da concentração de mRNA de HSP70-1 ($P < 0,0212$). (C) Aumento nos níveis de mRNA da HSP70-3 ($P < 0,0075$). (N= 5-6).

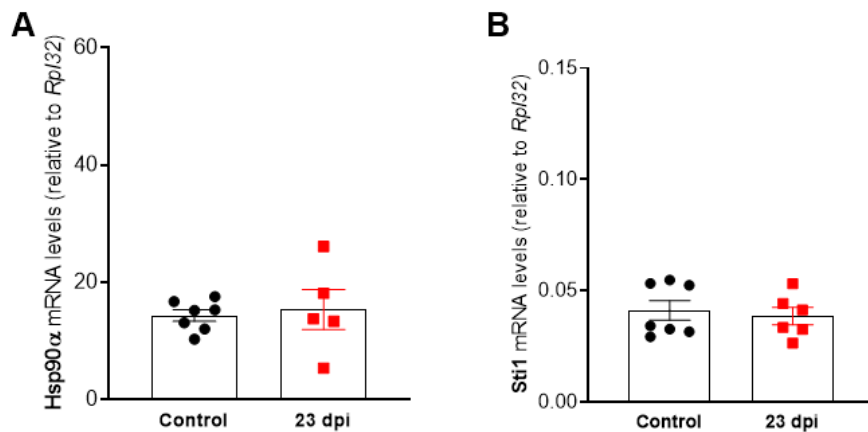


Gráfico 45 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no hipocampo com 23 dpi. (N= 5-7).

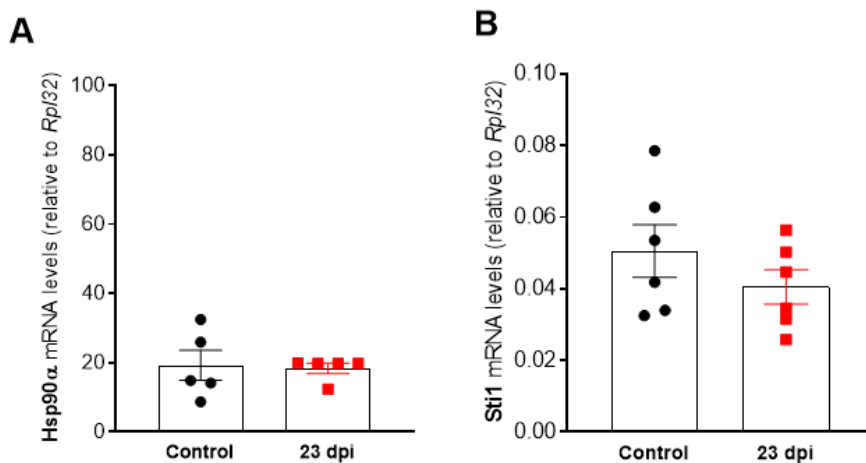


Gráfico 46 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 na substância negra com 23 dpi. (N= 5-6).

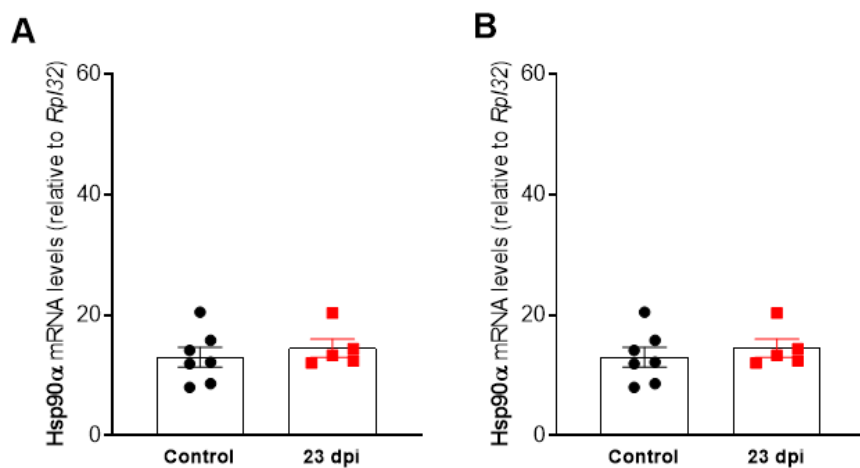


Gráfico 47 - Concentração dos níveis de mRNA de HSP90alfa, STI1 no estriado com 23 dpi. (N= 5-7).

8 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi caracterizar um modelo de sinucleinopatia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) para investigar o desenvolvimento de alterações comportamentais e clínicas, bem como mudanças nas vias do inflamassoma e das chaperonas. Os dados encontrados demonstram o surgimento de alterações prodrômicas, potencialmente mediadas por mudanças na via do inflamassoma e das chaperonas, dependendo da região cerebral e do momento da análise.

O modelo animal de sinucleinopatia induzida por LPS é capaz de causar alterações de memória e déficits cognitivos (SAVI et al., 2021). Estudos indicam que doses pequenas de LPS aplicadas consecutivamente resultam em alterações cognitivas precoces, enquanto o modelo de dose única leva ao desenvolvimento de alterações motoras mais tardias (DENG et al., 2020). Este último modelo tem sido utilizado como um modelo de DP devido à sua capacidade de induzir morte seletiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra, acompanhada de alterações motoras características do distúrbio (DENG; BOBROVSKAYA, 2022b). Embora os animais apresentem recuperação no modelo de doses menores e consecutivas de LPS, ele ainda é capaz de induzir um aumento na expressão de α -syn e provocar alterações cognitivas, marcadamente presentes na fase prodrômica da DP (MILDE et al., 2021; ZHANG; XU, 2018). Nesse contexto, o modelo de sinucleinopatia induzida por LPS surge como uma ferramenta relevante para investigações moleculares associadas a alterações comportamentais nas sinucleinopatias.

A seleção e a descrição da cepa do LPS são cruciais para garantir a reprodutibilidade dos estudos e o adequado desenho experimental do modelo, pois estão diretamente relacionadas ao grau de ativação imunológica e, conseqüentemente, à resposta clínica dos animais (MILDE et al., 2021). No entanto, muitos estudos não fornecem as especificações detalhadas sobre o LPS utilizado, o que pode resultar em respostas variáveis nos animais, mesmo quando o desenho experimental é semelhante, como pode ser observado na comparação entre os níveis de citocinas medidos neste estudo e aqueles encontrados por Zhang e Xu (ZHANG; XU, 2018). Nossos resultados demonstraram que a cepa de *Escherichia Coli*, mesmo em doses consideradas subagudas (250 μ g/kg/dia em alguns estudos), foi capaz de induzir alterações clínicas no modelo (DENEYER et al., 2019b; ZHANG; XU, 2018). Embora nossos dados clínicos tenham sido predominantemente observacionais, com exceção da perda de peso (Gráfico 1A), é importante ressaltar que observamos sintomas como pelagem arrepiada e opaca, hipoatividade, fezes ressecadas e corcovas mais proeminentes. Com o objetivo de evitar que um possível comportamento adoentado (*sickness behavior*) induzido pelo LPS pudesse gerar viés em nossos experimentos, optamos por utilizar o

Teste de Campo Aberto (OPF), considerado padrão ouro para avaliação de alterações no comportamento motor, como parâmetro inicial para iniciar os testes cognitivos (Gráficos 1B-D e 2E-H) (LAU et al., 2008). Assim, os resultados do OPF orientaram a escolha do momento para o início do treinamento no Barnes Maze, que foi iniciado no 10º dpi, uma vez que no 9º dpi (figura 19F) não foram mais observadas diferenças entre os grupos experimentais no Teste de Campo Aberto.

A antecedência com que a fase prodrômica emerge nas sinucleinopatias faz dela um momento oportuno para estudo e investigação, considerando que a sintomatologia clássica dessas doenças se manifesta tardiamente, como na DP, na qual os sintomas motores só surgem quando cerca de 60% dos neurônios dopaminérgicos da substância negra mesencefálica já sofreram degeneração (BRAAK et al., 2003). Nossos resultados revelaram que o LPS foi capaz de induzir alterações de memória hipocampal com 21 dpi (Gráfico 3A) e de trabalho com 32 dpi (Gráfico 3D) nos camundongos. É importante notar que essas alterações cognitivas têm sido consistentemente observadas em outros estudos de modelos murinos com LPS (SAVI et al., 2021; ZAKARIA et al., 2017; ZHANG; XU, 2018).

As alterações de memória são frequentemente encontradas em indivíduos recém-diagnosticados com DP, e estão relacionadas à presença de oligômeros na fenda sináptica (AARSLAND et al., 2017; MUSLIMOVIĆ et al., 2005; YAMADA; IWATSUBO, 2018). O aumento da expressão de α -syn no hipocampo como resultado do tratamento com LPS (Gráfico 4A) é consistente com achados na literatura que destacam alterações de memória identificadas precocemente (SAVI et al., 2021; ZAKARIA et al., 2017; ZHANG; XU, 2018). Além disso, aproximadamente 70% da α -syn extracelular surge da ativação neuronal, associada aos disparos de potenciais de ação, o que favorece sua propagação para outras vias e regiões neuroanatômicas (WU et al., 2010; YAMADA; IWATSUBO, 2018). É importante notar que cerca de 40% dos indivíduos com DP apresentam resposta imune a epítopos de α -syn (SULZER et al., 2017). Diante dessas informações, análises futuras por imunofluorescência podem ser úteis para determinar a co-localização da α -syn com possíveis regiões de interesse, como a fenda sináptica, micróglia e componentes da via das chaperonas, entre outras.

A neuroinflamação tem sido reconhecida como um alvo terapêutico relevante para o combate à neurodegeneração, sendo potencialmente modulada pela sinalização neurônio-microglia mediada pela via da fractalquina (CX3CL1-CX3CR1) (LIU; CHEN; CHANG, 2022; SUBBARAYAN et al., 2022). A CX3CL1 é uma quimiocina produzida por neurônios, e seu único receptor no SNC conhecido (CX3CR1) é encontrado em células microgliais (NOMIYAMA; OSADA; YOSHIE, 2013). Além disso, a fractalquina parece ter uma função central na função

cerebral normal. Camundongos *knock out* para CX3CR1 demonstram déficits cognitivos em tarefas de aprendizagem, diminuição da função sináptica e anormalidades na poda sináptica (ZHAN et al., 2014). Na DP, o efeito neuroprotetor da fractalquina já foi demonstrado (NASH et al., 2015). Nossos resultados revelaram uma redução significativa de fractalquina no hipocampo com 4 e 23 dpi (Gráficos 6A e 9A). A deficiência de CX3CL1 foi associada a déficits cognitivos relacionados ao hipocampo e ao cerebelo, e níveis reduzidos dessa quimiocina também foram observados em camundongos idosos (SUBBARAYAN et al., 2022). A regulação dos níveis basais de fractalquina é fundamental para o funcionamento adequado do SNC, estando o aumento dos seus níveis no SNC associado ao aumento da ativação do perfil pró-inflamatório microglial, enquanto a diminuição de seus níveis pode estar relacionada ao sofrimento neuronal (SUBBARAYAN et al., 2022). Portanto, a redução da CX3CL1 nas regiões e momentos investigados aqui indicam função neuronal alterada. Estudos sobre a CX3CL1-CX3CR1 no SNC usando camundongos que não expressam esses genes demonstraram haver um aumento da neurotoxicidade em modelos de neuroinflamação, como os induzidos por LPS, pois, na ausência do receptor de fractalquina, há um aumento da toxicidade devido a elevada atividade pró-inflamatória microglial, visto que a fractalquina induz a diminuição da superprodução de óxido nítrico, agente indutor de citocinas, como a IL1 β , TNF- α e IL-6 (Cardona et al., 2018; Garcia et al., 2013; Ransohoff et al., 2007).

Endotoxinas como o LPS são componentes da parede externa de bactérias gram-negativas e possuem uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo pirogenicidade, toxicidade letal, agregação plaquetária e indução de tolerância, entre outras (GALANOS, 1998). O LPS é um potente indutor bacteriano de citocina como o fator de necrose tumoral (TNF), IL-1 β , interferon gama (IFN γ) e quimiocinas (CAVAILLON, 2018). No entanto, a pré-exposição a endotoxinas pode levar a um fenômeno denominado tolerância, caracterizado por uma acentuada diminuição de TNF e outras citocinas, ou seja, causando uma redução na responsividade das células imunológicas ao LPS, prevenindo a mortalidade (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2006). Corroborando com esse dado, pacientes com DP apresentam uma menor concentração sérica da proteína de ligação a lipopolissacarídeo (LBP) cuja função principal é se ligar ao LPS para facilitar seu reconhecimento pelo sistema imunológico, indicando uma exposição crônica desses pacientes ao LPS (ADAMS et al., 2019). Estudos sugerem que a tolerância a endotoxinas está relacionada à desregulação da produção de citocinas como IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e TNF (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2006; GRANOWITZ et al., 1993; MUNOZ et al., 1991). Diante disso, a diminuição da concentração de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β no estriado com 4 e 23 dpi (Gráficos 7B e 10B), IL-18 no hipocampo com 23 dpi (Gráfico 9C), observadas em nossos resultados, pode estar associada a um processo de alteração da resposta imunológica induzida pela tolerância. É possível que as

expressões de mRNA do receptor CX3CR1 e das citocinas IL-18 e IL-1 β estejam alteradas como parte de um mecanismo de compensação relativo às variações nos níveis de citocinas, dependendo do *time point* e da região envolvida (Gráficos 12A e C; 15B e C; 16A e B; 17A).

Os fatores neurotróficos (FNT) são uma classe de pequenas proteínas extracelulares capazes de promover a sobrevivência, maturação e diferenciação de células neurais (VICARIO-ABEJÓN et al., 2002). Essa diversidade de papéis os torna relevantes na prevenção da morte progressiva de neurônios dopaminérgicos na DP (ARON; KLEIN, 2011). Vale ressaltar que alguns FNT facilitam a regeneração tecidual por meio de suas propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas, remielinizantes e de regeneração axonal (ELLIOTT DONAGHUE; TATOR; SHOICHET, 2015; YUAN et al., 2013). Os FNT são atualmente subdivididos em quatro famílias: as neurotrofinas, que incluem o BDNF e NGF, as neuroquinas, os derivados de células gliais, que compreendem o GDNF, e, a mais recentemente descoberta, a família dos derivados de astrócitos mesencefálicos (NASROLAHI et al., 2018).

Nosso grupo analisou os níveis de três FNT (BDNF, NGF e GDNF) no hipocampo, estriado e substância negra. No 4º DPI, encontramos uma diminuição de NGF hipocampal (Gráfico 18B) e um aumento de NGF estriatal (Gráfico 19B). O NGF desempenha um papel na proteção contra o estresse oxidativo, além de retardar a progressão da DP (NASROLAHI et al., 2018). A diminuição de seus níveis no hipocampo condiz com as alterações comportamentais encontradas com 23 dpi, enquanto o aumento de seu nível no estriado pode estar relacionado a um mecanismo de compensação/proteção. Observamos que, com 23 dpi, a concentração de NGF hipocampal permaneceu diminuída (Gráfico 21B) e, além disso, houve também uma diminuição nos níveis de BDNF (Gráfico 21A). Na DP, o BDNF atua regulando a função motora, plasticidade, reparo e promoção da sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos, indicando que essa região continuou sob estresse (NASROLAHI et al., 2018). Além disso, os níveis de NGF estriatais continuaram menores com 23 dpi (Gráfico 22B), revelando uma alteração persistente até o momento. Por fim, com 23 dpi, também houve mudanças dos níveis de FNT na substância Negra (Gráfico 23B e C), que, com 4 dpi, não se mostrou afetada, havendo uma diminuição de NGF e um aumento de GDNF, esse último com função protetora e restauradora de neurônios (NASROLAHI et al., 2018).

As proteínas de choque térmico (HSP), membros da via das chaperonas, são capazes de regular a inflamação via inflamassoma em diferentes contextos. Alguns membros das chaperonas atuam a favor da ativação do inflamassoma, enquanto outros o inibem. As proteínas de choque térmico HSP70 e HSP90 possuem funções centrais na via das chaperonas e, juntamente com a HSP40 e STI1, formam um maquinário proteico de ação transitória que atua conjuntamente em funções associadas ao dobramento, degradação e manutenção de proteínas clientes (LACKIE et al.,

2017). Aos 4 dpi, encontramos alterações relacionadas a essa via na substância negra e no estriado, com aumento de HSP70-1 na substância negra (Gráfico 37B) e uma diminuição de STI1 (Gráfico 41B) para esta mesma região. No estriado, houve um aumento de outra isoforma, a HSP70-3 e de HSP40 (Gráfico 38C e A). A presença associada de hetero-oligômeros nas chaperonas tem sido associada a alterações patológicas em doenças neurodegenerativas.(GINSBERG et al., 2022). Nesse contexto, em vez da rede de chaperonas atuar no dobramento e degradação de proteínas por complexos menores transitórios, essas proteínas acabam atuando como uma rede multimolecular que remodela patologicamente os processos celulares, mantendo os fenótipos celulares alterados (epichaperoma) (GINSBERG et al., 2022; KISHINEVSKY et al., 2018; RODINA et al., 2016). Aos 23° dpi, encontramos diminuições na expressão de HSP70-1 e HSP70-3 no hipocampo (Gráfico 42B e C), aumento de HSP70-1 no estriado (Gráfico 43B) e aumento dos níveis de expressão da HSP70-1 e da HSP70-3 na substância negra (Gráfico 44B e C), revelando alterações sítio e tempo específicas.

Associando as alterações da via das chaperonas com as do inflamassoma, identificou-se um aumento na expressão de mRNA de Caspase-1 no hipocampo com 4 dpi (Gráfico 24C) e de P50 (Gráfico 29A), um dos intermediários da via do NF- κ B, na substância negra. A HSP70 extracelular é capaz de se ligar a monócitos humanos, levando ao aumento da expressão de pró-IL-1 β , TNF α e IL-6, de forma dependente de NF- κ B funcional/ativado, que translocará para o núcleo, favorecendo a ativação do inflamassoma, por ativação do primeiro estágio (priming) (MARTINE; RÉBÉ, 2019). No entanto, ainda não existem estudos correlacionando o aumento da produção de pró-IL-1 β com o aumento de IL-1 β por ativação do inflamassoma (Asea et al., 2000). Aos 23 dpi, foram observados aumentos no receptor NLRP3 no hipocampo (Gráfico 30A) e na Caspase-1 no estriado (Gráfico 31C). Além disso, encontramos diminuições de P50 hipocampal (Gráfico 33A) e estriatal (Gráfico 34A). A HSP90 é capaz de interagir com o receptor do NLRP3, levando à sua estabilização e proteção contra mecanismos de autofagia (KHALAFALLA et al., 2017; MAYOR et al., 2007). Por último, além dos efeitos positivos das chaperonas na regulação da ativação do inflamassoma, também já foram descritos efeitos de regulação negativa, como a da HSP70 sobre o inflamassoma. Demonstrou-se que sua superexpressão é capaz de diminuir a interação NLRP3/ASC, a ativação de caspase-1 e a produção de IL-1 β (MARTINE; RÉBÉ, 2019). Assim, a HSP70 desempenha um papel ambivalente na ativação do inflamassoma, dependendo de sua localização. Quando extracelular, atua como um indutor da expressão de pró-IL-1 β , enquanto intracelularmente exerce um papel inibidor (ASEA et al., 2000; MARTINE et al., 2019).

Uma vez que o modelo se mostrou capaz de causar alterações prodrômicas e nas duas vias aqui destacadas, sua utilização se mostra relevante para a investigação das sinucleinopatias e aponta

para a alteração dessas vias nessas desordens, podendo ser investigadas como possíveis marcadores e alvos terapêuticos para o futuro. Nossos resultados levantam a possibilidade da inibição da HSP90 resultando na inibição do inflamassoma como um possível alvo para inibir ou retardar a progressão desses distúrbios, principalmente se essas alterações puderem ser identificadas na fase prodrômica.

Como limitação, pode ser citada a não inclusão de camundongos fêmeas no modelo. A inclusão de fêmeas é fundamental para identificarmos especificidades com relação ao sexo dos animais, já que a prevalência na DP apresenta uma dicotomia entre os sexos em humanos, com maior prevalência no sexo masculino.

Como perspectivas futuras, pretendemos investigar a presença de α -syn patogênica por técnica de western blot, validação do uso da dose única mais concentrada e o surgimento da sintomatologia motora associada à DP, a co-localização da α -syn com micróglia, astrócitos e chaperonas, a hipótese de double-hit com modelo genético da DP (A53T) em parceria com grupo canadense liderado pelo Dr. Marco Prado que trabalha com a via das chaperonas, o tratamento com inibidor concomitante para inflamassoma e HSP90 e a investigação de alterações no trato gastrointestinal e na composição da microbiota fecal dos animais, regiões associadas a outros sinais prodrômicos de alta prevalência.

9 CONCLUSÃO

O modelo LPS de sinucleinopatia demonstrou ser um modelo potencial para o estudo de alterações prodrômicas potencialmente mediadas por mudanças na via do inflamassoma e das chaperonas. Essas alterações parecem ser dependentes da região cerebral e do tempo. Considerando as sinucleinopatias como um conjunto de distúrbios neurodegenerativos de alta prevalência global, com impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes e associados a custos elevados para os sistemas de saúde mundial, esses achados são importantes por identificarem alterações em vias relevantes nessas desordens. Isso permite o aprofundamento da investigação da fisiopatologia dessas desordens e contribui para avanços no limiar de fronteira do conhecimento da área, podendo ser útil também na investigação de novos alvos farmacológicos para as sinucleinopatias.

10 REFERÊNCIAS

- AARSLAND, D. et al. Cognitive decline in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 4, p. 217–231, abr. 2017.
- AARSLAND, D. et al. Parkinson disease-associated cognitive impairment. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 7, n. 1, p. 1–21, 1 jul. 2021.
- ADAMS, B. et al. Parkinson's Disease: A Systemic Inflammatory Disease Accompanied by Bacterial Inflammagens. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, p. 210, 2019.
- AHMED, S. et al. Andrographolide suppresses NLRP3 inflammasome activation in microglia through induction of parkin-mediated mitophagy in in-vitro and in-vivo models of Parkinson disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 91, p. 142–158, 1 jan. 2021.
- ALEGRE-ABARRATEGUI, J. et al. Selective vulnerability in α -synucleinopathies. **Acta Neuropathologica**, v. 138, n. 5, p. 681–704, nov. 2019.
- ALVES, B. / O. / O.-M. **11/4 – Dia Mundial de Conscientização da Doença de Parkinson | Biblioteca Virtual em Saúde MS.** , [s.d.]. Disponível em: <<https://bvsmms.saude.gov.br/11-4-dia-mundial-de-conscientizacao-da-doenca-de-parkinson/>>. Acesso em: 11 jun. 2023
- ARMSTRONG, M. J.; OKUN, M. S. Diagnosis and Treatment of Parkinson Disease: A Review. **JAMA**, v. 323, n. 6, p. 548–560, 11 fev. 2020.
- ARON, L.; KLEIN, R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. **Trends in Neurosciences**, v. 34, n. 2, p. 88–100, fev. 2011.
- ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 12, p. 1257–1272, nov. 2016.
- ASEA, A. et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 435–442, abr. 2000.
- B, L. et al. Vagotomy and Parkinson disease: A Swedish register-based matched-cohort study. **Neurology**, v. 88, n. 21, 23 maio 2017.
- BAKHSI, S.; SHAMSI, S. MCC950 in the treatment of NLRP3-mediated inflammatory diseases: Latest evidence and therapeutic outcomes. **International Immunopharmacology**, v. 106, p. 108595, 1 maio 2022.
- BALE, T. L. et al. Mice deficient for corticotropin-releasing hormone receptor-2 display anxiety-like behaviour and are hypersensitive to stress. **Nature Genetics**, v. 24, n. 4, p. 410–414, abr. 2000.
- BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800–808, 6 jun. 2006.

BARTKOWIAK, K.; PANTEL, K. A shocking protein complex. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 322–323, out. 2016.

BEIER, E. E. et al. Alternative microglial activation is associated with cessation of progressive dopamine neuron loss in mice systemically administered lipopolysaccharide. **Neurobiology of Disease**, v. 108, p. 115–127, 1 dez. 2017.

BENDOR, J. T.; LOGAN, T. P.; EDWARDS, R. H. The Function of α -Synuclein. **Neuron**, v. 79, n. 6, p. 1044–1066, 18 set. 2013.

BERG, D. et al. Prodromal Parkinson disease subtypes — key to understanding heterogeneity. **Nature Reviews Neurology**, v. 17, n. 6, p. 349–361, jun. 2021.

BERNAL-CONDE, L. D. et al. Alpha-Synuclein Physiology and Pathology: A Perspective on Cellular Structures and Organelles. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, p. 1399, 2019.

BERTELLI, J. A.; MIRA, J. C. The grasping test: a simple behavioral method for objective quantitative assessment of peripheral nerve regeneration in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 58, n. 1, p. 151–155, 1 maio 1995.

BLOEM, B. R.; OKUN, M. S.; KLEIN, C. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 397, n. 10291, p. 2284–2303, jun. 2021.

BODEA, L.-G. et al. Neurodegeneration by Activation of the Microglial Complement–Phagosome Pathway. **Journal of Neuroscience**, v. 34, n. 25, p. 8546–8556, 18 jun. 2014.

BOHNEN, N. I. et al. Olfactory dysfunction, central cholinergic integrity and cognitive impairment in Parkinson's disease. **Brain**, v. 133, n. 6, p. 1747–1754, jun. 2010.

BOLAM, J. P.; PISSADAKI, E. K. Living on the edge with too many mouths to feed: Why dopamine neurons die. **Movement Disorders**, v. 27, n. 12, p. 1478–1483, 2012.

BORKOVICH, K. A. et al. hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 9, p. 3919–3930, set. 1989.

BOUET, V. et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. **Nature Protocols**, v. 4, n. 10, p. 1560–1564, out. 2009.

BOVOLENTA, T. M. et al. Systematic Review and Critical Analysis of Cost Studies Associated with Parkinson's Disease. **Parkinson's Disease**, v. 2017, p. e3410946, 5 mar. 2017.

BOVOLENTA, T. M.; FELÍCIO, A. C. Parkinson's patients in the Brazilian Public Health Policy context. **Einstein**, v. 14, n. 3, p. 7–9, 2016.

BRAAK, H. et al. Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by α -synuclein immunocytochemistry. **Neuroscience Letters**, v. 265, n. 1, p. 67–69, 9 abr. 1999.

BRAAK, H. et al. Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 24, n. 2, p. 197–211, 1 mar. 2003.

- BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, out. 2004.
- BRANCHI, I. et al. Nonmotor symptoms in Parkinson's disease: investigating early-phase onset of behavioral dysfunction in the 6-hydroxydopamine-lesioned rat model. **Journal of Neuroscience Research**, v. 86, n. 9, p. 2050–2061, jul. 2008.
- BRÁS, I. C. et al. Synucleinopathies: Where we are and where we need to go. **Journal of Neurochemistry**, v. 153, n. 4, p. 433–454, maio 2020a.
- BRÁS, I. C. et al. Synucleinopathies: Where we are and where we need to go. **Journal of Neurochemistry**, v. 153, n. 4, p. 433–454, maio 2020b.
- BRÁS, I. C.; OUTEIRO, T. F. Alpha-Synuclein: Mechanisms of Release and Pathology Progression in Synucleinopathies. **Cells**, v. 10, n. 2, p. 375, 12 fev. 2021.
- BREHME, M. et al. A Chaperome Subnetwork Safeguards Proteostasis in Aging and Neurodegenerative Disease. **Cell Reports**, v. 9, n. 3, p. 1135–1150, 6 nov. 2014.
- BRIDI, J. C.; HIRTH, F. Mechanisms of α -Synuclein Induced Synaptopathy in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 12, 2018.
- BUDSON, A. E.; PRICE, B. H. Memory dysfunction. **The New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 7, p. 692–699, 17 fev. 2005.
- BURRÉ, J.; SHARMA, M.; SÜDHOF, T. C. α -Synuclein assembles into higher-order multimers upon membrane binding to promote SNARE complex formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 40, p. E4274–E4283, 7 out. 2014.
- CARDONA, S. M. et al. Role of the Fractalkine Receptor in CNS Autoimmune Inflammation: New Approach Utilizing a Mouse Model Expressing the Human CX3CR1I249/M280 Variant. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, 17 out. 2018.
- CARLESIMO, G. A. et al. Hippocampal abnormalities and memory deficits in Parkinson disease: a multimodal imaging study. **Neurology**, v. 78, n. 24, p. 1939–1945, 12 jun. 2012.
- CASCELLA, R. et al. Effects of oligomer toxicity, fibril toxicity and fibril spreading in synucleinopathies. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 79, n. 3, p. 174, 4 mar. 2022.
- CAVAILLON, J.-M. Exotoxins and endotoxins: Inducers of inflammatory cytokines. **Toxicon**, *Toxins: Immunity, Inflammation and Pain*, v. 149, p. 45–53, 1 jul. 2018.
- CAVAILLON, J.-M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: Endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. **Critical Care**, v. 10, n. 5, p. 233, 13 out. 2006.
- CECARINI, V. et al. Amyloid peptides in different assembly states and related effects on isolated and cellular proteasomes. **Brain Research**, v. 1209, p. 8–18, 13 maio 2008.
- CERRI, S.; MUS, L.; BLANDINI, F. Parkinson's Disease in Women and Men: What's the Difference? **Journal of Parkinson's Disease**, v. 9, n. 3, p. 501–515, 1 jan. 2019.

- CHATTERJEE, K. et al. Inflammasome and α -synuclein in Parkinson's disease: A cross-sectional study. **Journal of Neuroimmunology**, v. 338, p. 577089, 15 jan. 2020.
- CHOI, D.-Y. et al. Striatal neuroinflammation promotes Parkinsonism in rats. **PloS One**, v. 4, n. 5, p. e5482, 2009.
- CHOI, D.-Y.; ZHANG, J.; BING, G. Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 9, p. 1649–1653, set. 2010.
- CIECHANOVER, A.; BRUNDIN, P. The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. **Neuron**, v. 40, n. 2, p. 427–446, 9 out. 2003.
- CLAASSEN, D. O. et al. REM sleep behavior disorder preceding other aspects of synucleinopathies by up to half a century. **Neurology**, v. 75, n. 6, p. 494–499, 10 ago. 2010.
- CLAYTON, B. L. L.; POPKO, B. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia. **Brain Research**, ER stress and neurodegenerative diseases: From disease mechanism to therapies. v. 1648, p. 594–602, 1 out. 2016.
- CLOUTIER, C. J.; KAVALIERS, M.; OSSENKOPP, K.-P. Rodent sex differences in disgust behaviors (anticipatory nausea) conditioned to a context associated with the effects of the toxin LiCl: Inhibition of conditioning following immune stimulation with lipopolysaccharide. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Sex differences on drugs affecting behavior. v. 152, p. 4–12, 1 jan. 2017.
- COLLA, E. et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Important for the Manifestations of α -Synucleinopathy In Vivo. **Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 10, p. 3306–3320, 7 mar. 2012.
- COON, E. A. et al. Clinical features and autonomic testing predict survival in multiple system atrophy. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 138, n. Pt 12, p. 3623–3631, dez. 2015.
- COON, E. A.; SINGER, W. Synucleinopathies. **Continuum (Minneapolis, Minn.)**, v. 26, n. 1, p. 72–92, fev. 2020.
- COOPER, J. F.; VAN RAAMSDONK, J. M. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. 1, p. 17–32, 1 jan. 2018.
- COSTA, H. N. et al. Parkinson's Disease: A Multisystem Disorder. **Neuroscience Bulletin**, v. 39, n. 1, p. 113–124, 1 jan. 2023.
- CROWTHER, R. A. et al. Synthetic filaments assembled from C-terminally truncated α -synuclein. **FEBS Letters**, v. 436, n. 3, p. 309–312, 1998.
- DAS, T.; HWANG, J. J.; POSTON, K. L. Episodic recognition memory and the hippocampus in Parkinson's disease: A review. **Cortex**, v. 113, p. 191–209, 1 abr. 2019.
- DAWSON, T. M.; KO, H. S.; DAWSON, V. L. Genetic animal models of Parkinson's disease. **Neuron**, v. 66, n. 5, p. 646–661, 10 jun. 2010.
- DE CASTRO, B. M. et al. Reduced expression of the vesicular acetylcholine transporter causes learning deficits in mice. **Genes, Brain and Behavior**, v. 8, n. 1, p. 23–35, 2009.

DE PABLO-FERNÁNDEZ, E. et al. Prognosis and Neuropathologic Correlation of Clinical Subtypes of Parkinson Disease. **JAMA neurology**, v. 76, n. 4, p. 470–479, 1 abr. 2019.

DENEYER, L. et al. Systemic LPS-induced neuroinflammation increases the susceptibility for proteasome inhibition-induced degeneration of the nigrostriatal pathway. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 68, p. 26–32, 1 nov. 2019a.

DENEYER, L. et al. Systemic LPS-induced neuroinflammation increases the susceptibility for proteasome inhibition-induced degeneration of the nigrostriatal pathway. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 68, p. 26–32, 1 nov. 2019b.

DENG, I. et al. Lipopolysaccharide animal models of Parkinson's disease: Recent progress and relevance to clinical disease. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 4, p. 100060, 1 abr. 2020.

DENG, I.; BOBROVSKAYA, L. Lipopolysaccharide mouse models for Parkinson's disease research: a critical appraisal. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 11, p. 2413, nov. 2022a.

DENG, I.; BOBROVSKAYA, L. Lipopolysaccharide mouse models for Parkinson's disease research: a critical appraisal. **Neural Regeneration Research**, v. 17, n. 11, p. 2413, nov. 2022b.

DEVI, L. et al. Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 14, p. 9089–9100, 4 abr. 2008.

DÍAZ-HERNÁNDEZ, M. et al. Inhibition of 26S proteasome activity by huntingtin filaments but not inclusion bodies isolated from mouse and human brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1585–1596, set. 2006.

DIJKSTRA, A. A. et al. Evidence for Immune Response, Axonal Dysfunction and Reduced Endocytosis in the Substantia Nigra in Early Stage Parkinson's Disease. **PloS One**, v. 10, n. 6, p. e0128651, 2015.

DOENNI, V. M. et al. Early-life inflammation with LPS delays fear extinction in adult rodents. **Brain, Behavior, and Immunity, Perinatal Inflammation**. v. 63, p. 176–185, 1 jul. 2017.

DORSEY, E. R. et al. The Emerging Evidence of the Parkinson Pandemic. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 8, n. s1, p. S3–S8, 1 jan. 2018a.

DORSEY, E. R. et al. Global, regional, and national burden of Parkinson's disease, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet Neurology**, v. 17, n. 11, p. 939–953, 1 nov. 2018b.

DOVONOU, A. et al. Animal models of Parkinson's disease: bridging the gap between disease hallmarks and research questions. **Translational Neurodegeneration**, v. 12, n. 1, p. 36, 19 jul. 2023.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association. American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–209, mar. 1957.

ELLIOTT DONAGHUE, I.; TATOR, C. H.; SHOICHET, M. S. Sustained delivery of bioactive neurotrophin-3 to the injured spinal cord. **Biomaterials Science**, v. 3, n. 1, p. 65–72, jan. 2015.

EMMANOUILIDOU, E.; STEFANIS, L.; VEKRELLIS, K. Cell-produced alpha-synuclein oligomers are targeted to, and impair, the 26S proteasome. **Neurobiology of Aging**, v. 31, n. 6, p. 953–968, jun. 2010.

ENGELHARDT, E. Lafora and Trétiakoff: the naming of the inclusion bodies discovered by Lewy. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 10, p. 751–753, out. 2017a.

ENGELHARDT, E. Lafora and Trétiakoff: the naming of the inclusion bodies discovered by Lewy. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 75, n. 10, p. 751–753, out. 2017b.

ERB, M. L.; MOORE, D. J. LRRK2 and the Endolysosomal System in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 10, n. 4, p. 1271–1291, 2020.

ERKKINEN, M. G.; KIM, M.-O.; GESCHWIND, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, p. a033118, 2 abr. 2018a.

ERKKINEN, M. G.; KIM, M.-O.; GESCHWIND, M. D. Clinical Neurology and Epidemiology of the Major Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 10, n. 4, p. a033118, 2 abr. 2018b.

FASANO, A. et al. Falls in Parkinson's disease: A complex and evolving picture. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 32, n. 11, p. 1524–1536, nov. 2017.

FEIGIN, V. L. et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Neurology**, v. 16, n. 11, p. 877–897, 1 nov. 2017.

FELLNER, L. et al. Autophagy in α -Synucleinopathies-An Overstrained System. **Cells**, v. 10, n. 11, p. 3143, 12 nov. 2021.

FERREIRA, C. R.; GAHL, W. A. Lysosomal storage diseases. **Translational Science of Rare Diseases**, v. 2, n. 1–2, p. 1–71, 25 maio 2017.

FORSYTH, C. B. et al. Increased intestinal permeability correlates with sigmoid mucosa alpha-synuclein staining and endotoxin exposure markers in early Parkinson's disease. **PloS One**, v. 6, n. 12, p. e28032, 2011.

FU, J.; WU, H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation. **Annual Review of Immunology**, v. 41, p. 301–316, 26 abr. 2023.

GAENSLEN, A. et al. The patients' perception of prodromal symptoms before the initial diagnosis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 26, n. 4, p. 653–658, 2011.

GALANOS, C. Endotoxin (Lipopolysaccharide (LPS)). Em: DELVES, P. J. (Ed.). **Encyclopedia of Immunology (Second Edition)**. Oxford: Elsevier, 1998. p. 806–809.

GALVES, M. et al. Ubiquitin Signaling and Degradation of Aggregate-Prone Proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 44, n. 10, p. 872–884, out. 2019.

GARCIA, J. A. et al. Regulation of adaptive immunity by the fractalkine receptor during autoimmune inflammation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 191, n. 3, p. 1063–1072, 1 ago. 2013.

GINSBERG, S. D. et al. Disease-specific interactome alterations via epichaperomics: the case for Alzheimer's disease. **The FEBS journal**, v. 289, n. 8, p. 2047–2066, abr. 2022.

GOEDERT, M. et al. 100 years of Lewy pathology. **Nature Reviews Neurology**, v. 9, n. 1, p. 13–24, jan. 2013.

GOLDMAN, J. G.; SIEG, E. Cognitive Impairment and Dementia in Parkinson Disease. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 36, n. 2, p. 365–377, 1 maio 2020.

GOLDMAN, S. M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 54, p. 141–164, 2014.

GORBATYUK, M. S. et al. Glucose regulated protein 78 diminishes α -synuclein neurotoxicity in a rat model of Parkinson disease. **Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 20, n. 7, p. 1327–1337, jul. 2012.

GORDON, R. et al. Inflammasome inhibition prevents α -synuclein pathology and dopaminergic neurodegeneration in mice. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 465, p. eaah4066, 31 out. 2018.

GORNO-TEMPINI, M. L. et al. Classification of primary progressive aphasia and its variants. **Neurology**, v. 76, n. 11, p. 1006–1014, 15 mar. 2011.

GOTO, K. et al. Depression in multiple system atrophy: a case report. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 54, n. 4, p. 507–511, ago. 2000.

GRANOWITZ, E. V. et al. Intravenous endotoxin suppresses the cytokine response of peripheral blood mononuclear cells of healthy humans. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 151, n. 3, p. 1637–1645, 1 ago. 1993.

GREENE, J. C. et al. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 4078–4083, 1 abr. 2003.

GROOTJANS, J. et al. The unfolded protein response in immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 8, p. 469–484, ago. 2016.

HAQUE, M. E. et al. Targeting the microglial NLRP3 inflammasome and its role in Parkinson's disease. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 35, n. 1, p. 20–33, jan. 2020.

HASEGAWA, S. et al. Intestinal Dysbiosis and Lowered Serum Lipopolysaccharide-Binding Protein in Parkinson's Disease. **PloS One**, v. 10, n. 11, p. e0142164, 2015.

HEIDARI, A.; YAZDANPANA, N.; REZAEI, N. The role of Toll-like receptors and neuroinflammation in Parkinson's disease. **Journal of Neuroinflammation**, v. 19, n. 1, p. 135, 6 jun. 2022.

HELY, M. A. et al. The Sydney multicenter study of Parkinson's disease: The inevitability of dementia at 20 years. **Movement Disorders**, v. 23, n. 6, p. 837–844, 2008.

HENEKA, M. T.; MCMANUS, R. M.; LATZ, E. Inflammasome signalling in brain function and neurodegenerative disease. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 19, n. 10, p. 610–621, out. 2018.

HERNANDEZ-BALTAZAR, D.; ZAVALA-FLORES, L. M.; VILLANUEVA-OLIVO, A. The 6-hydroxydopamine model and parkinsonian pathophysiology: Novel findings in an older model. **Neurología (English Edition)**, v. 32, n. 8, p. 533–539, 1 out. 2017.

HERRERA, A. J. et al. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. **Neurobiology of Disease**, v. 7, n. 4, p. 429–447, ago. 2000.

HETZ, C.; SAXENA, S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. **Nature Reviews Neurology**, v. 13, n. 8, p. 477–491, ago. 2017.

HETZ, C.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 8, p. 421–438, ago. 2020.

HILKER, R. et al. Nonlinear progression of Parkinson disease as determined by serial positron emission tomographic imaging of striatal fluorodopa F 18 activity. **Archives of Neurology**, v. 62, n. 3, p. 378–382, mar. 2005.

HIRTZ, D. et al. How common are the “common” neurologic disorders? **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 326–337, 30 jan. 2007.

HOOGLAND, I. C. M. et al. Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments. **Journal of Neuroinflammation**, v. 12, p. 114, 6 jun. 2015.

HORSAGER, J. et al. Brain-first versus body-first Parkinson's disease: a multimodal imaging case-control study. **Brain**, v. 143, n. 10, p. 3077–3088, 1 out. 2020.

IBGE. **População cresce, mas número de pessoas com menos de 30 anos cai 5,4% de 2012 a 2021** \textbar Agência de Notícias. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34438-populacao-cresce-mas-numero-de-pessoas-com-menos-de-30-anos-cai-5-4-de-2012-a-2021>>. Acesso em: 11 jun. 2023.

ISAACS, J. S.; XU, W.; NECKERS, L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. **Cancer Cell**, v. 3, n. 3, p. 213–217, 1 mar. 2003.

IZQUIERDO, I.; MCGAUGH, J. L. Behavioural pharmacology and its contribution to the molecular basis of memory consolidation: **Behavioral Pharmacology**, v. 11, n. 7, p. 517–534, nov. 2000.

JACKSON-LEWIS, V.; PRZEDBORSKI, S. Protocol for the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Nature Protocols**, v. 2, n. 1, p. 141–151, jan. 2007.

JANG, A. et al. Non-classical exocytosis of alpha-synuclein is sensitive to folding states and promoted under stress conditions. **Journal of Neurochemistry**, v. 113, n. 5, p. 1263–1274, jun. 2010.

- JO, E.-K. et al. Molecular mechanisms regulating NLRP3 inflammasome activation. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, n. 2, p. 148–159, mar. 2016.
- JOHNSON, M. E. et al. Triggers, Facilitators, and Aggravators: Redefining Parkinson's Disease Pathogenesis. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 1, p. 4–13, 1 jan. 2019.
- KALIA, L. V.; LANG, A. E. Parkinson's disease. **The Lancet**, v. 386, n. 9996, p. 896–912, ago. 2015.
- KALUEFF, A. V. **Animal Models in Biological Psychiatry**. [s.l.] Nova Publishers, 2006.
- KAM, T.-I. et al. Microglia and astrocyte dysfunction in parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 144, p. 105028, 1 out. 2020.
- KAY, K. R.; UC, E. Y. Chapter 5 - Real-life consequences of cognitive dysfunction in Parkinson's disease. Em: NARAYANAN, N. S.; ALBIN, R. L. (Eds.). **Progress in Brain Research**. Cognition in Parkinson's Disease. [s.l.] Elsevier, 2022. v. 269p. 113–136.
- KHALAFALLA, M. G. et al. P2X7 receptor antagonism prevents IL-1 β release from salivary epithelial cells and reduces inflammation in a mouse model of autoimmune exocrinopathy. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 40, p. 16626–16637, 6 out. 2017.
- KIM, S. et al. Transneuronal Propagation of Pathologic α -Synuclein from the Gut to the Brain Models Parkinson's Disease. **Neuron**, v. 103, n. 4, p. 627- 641.e7, 21 ago. 2019.
- KIRCHHOF, K. et al. Erectile and urinary dysfunction may be the presenting features in patients with multiple system atrophy: a retrospective study. **International Journal of Impotence Research**, v. 15, n. 4, p. 293–298, ago. 2003.
- KISHINEVSKY, S. et al. HSP90-incorporating chaperome networks as biosensor for disease-related pathways in patient-specific midbrain dopamine neurons. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4345, 19 out. 2018.
- KOGA, S. et al. Neuropathology and molecular diagnosis of Synucleinopathies. **Molecular Neurodegeneration**, v. 16, n. 1, p. 83, 18 dez. 2021.
- KOSAKA, K. et al. Presenile dementia with Alzheimer-, Pick- and Lewy-body changes. **Acta Neuropathologica**, v. 36, n. 3, p. 221–233, 15 nov. 1976.
- KRAMER, M. L.; SCHULZ-SCHAEFFER, W. J. Presynaptic α -Synuclein Aggregates, Not Lewy Bodies, Cause Neurodegeneration in Dementia with Lewy Bodies. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1405–1410, 7 fev. 2007.
- LA, C. et al. Hippocampal CA1 subfield predicts episodic memory impairment in Parkinson's disease. **NeuroImage. Clinical**, v. 23, p. 101824, 2019.
- LACKIE, R. E. et al. The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 11, p. 254, 2017.
- LACKIE, R. E. et al. Stress-inducible phosphoprotein 1 (HOP/STI1/STIP1) regulates the accumulation and toxicity of α -synuclein in vivo. **Acta Neuropathologica**, v. 144, n. 5, p. 881–910, 1 nov. 2022.

- LANGSTON, J. W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 219, n. 4587, p. 979–980, 25 fev. 1983.
- LAU, A. A. et al. Open field locomotor activity and anxiety-related behaviors in mucopolysaccharidosis type IIIA mice. **Behavioural Brain Research**, v. 191, n. 1, p. 130–136, 5 ago. 2008.
- LEE, H.-J. et al. Models of multiple system atrophy. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 51, n. 11, p. 1–10, nov. 2019.
- LEE, J.-Y. et al. Multimodal brain and retinal imaging of dopaminergic degeneration in Parkinson disease. **Nature Reviews Neurology**, v. 18, n. 4, p. 203–220, abr. 2022.
- LI, M. et al. The association between Parkinson’s disease and autoimmune diseases: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, p. 1103053, 2023.
- LI, Y. et al. Targeting Microglial α -Synuclein/TLRs/NF-kappaB/NLRP3 Inflammasome Axis in Parkinson’s Disease. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 719807, 2021.
- LIN, C.-H. et al. Risk of Parkinson’s disease following anxiety disorders: a nationwide population-based cohort study. **European Journal of Neurology**, v. 22, n. 9, p. 1280–1287, set. 2015.
- LINDERSSON, E. et al. Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 13, p. 12924–12934, 26 mar. 2004.
- LIU, J. et al. The role of the Golgi apparatus in disease (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 47, n. 4, p. 1–1, 1 abr. 2021.
- LIU, T.-W.; CHEN, C.-M.; CHANG, K.-H. Biomarker of Neuroinflammation in Parkinson’s Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4148, 8 abr. 2022.
- LIU, Y. et al. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits. **NeuroToxicology**, Twenty-Fourth International Neurotoxicology Conference: “Environmental Etiologies of Neurological Disorders - Modifiers of Risk”. v. 29, n. 5, p. 864–870, 1 set. 2008.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- LONGHENA, F. et al. The Contribution of α -Synuclein Spreading to Parkinson’s Disease Synaptopathy. **Neural Plasticity**, v. 2017, p. e5012129, 3 jan. 2017.
- LÓPEZ-SENDÓN, J.; MENA, M. A.; DE YÉBENES, J. G. Drug-induced parkinsonism. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 4, p. 487–496, jul. 2013.
- LUBRICH, C.; GIESLER, P.; KIPP, M. Motor Behavioral Deficits in the Cuprizone Model: Validity of the Rotarod Test Paradigm. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, p. 11342, jan. 2022.

- LUNDBLAD, M. et al. Impaired neurotransmission caused by overexpression of α -synuclein in nigral dopamine neurons. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 9, p. 3213–3219, 28 fev. 2012.
- MACRAE, M. et al. Tracing the trajectory of behavioral impairments and oxidative stress in an animal model of neonatal inflammation. **Neuroscience**, v. 298, p. 455–466, 9 jul. 2015.
- MARTINE, P. et al. HSP70 is a negative regulator of NLRP3 inflammasome activation. **Cell Death & Disease**, v. 10, n. 4, p. 256, 15 mar. 2019.
- MARTINE, P.; RÉBÉ, C. Heat Shock Proteins and Inflammasomes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, p. 4508, 12 set. 2019.
- MARTÍNEZ, J. H. et al. Alpha-synuclein mitochondrial interaction leads to irreversible translocation and complex I impairment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 651, p. 1–12, 1 ago. 2018.
- MARTINEZ-MARTÍN, P. et al. Parkinson Symptoms and Health Related Quality of Life as Predictors of Costs: A Longitudinal Observational Study with Linear Mixed Model Analysis. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0145310, 2015.
- MARTÍNEZ-MENÁRGUEZ, J. Á. et al. Golgi Fragmentation in Neurodegenerative Diseases: Is There a Common Cause? **Cells**, v. 8, n. 7, p. 748, jul. 2019.
- MATHEOUD, D. et al. Intestinal infection triggers Parkinson's disease-like symptoms in Pink1^{-/-} mice. **Nature**, v. 571, n. 7766, p. 565–569, jul. 2019.
- MATSUDA, W. et al. Single Nigrostriatal Dopaminergic Neurons Form Widely Spread and Highly Dense Axonal Arborizations in the Neostriatum. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 2, p. 444–453, 14 jan. 2009.
- MATTHEWS, B. R. Memory dysfunction. **Continuum (Minneapolis, Minn.)**, v. 21, n. 3 Behavioral Neurology and Neuropsychiatry, p. 613–626, jun. 2015.
- MAYOR, A. et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. **Nature Immunology**, v. 8, n. 5, p. 497–503, maio 2007.
- MEHRA, S.; SAHAY, S.; MAJI, S. K. α -Synuclein misfolding and aggregation: Implications in Parkinson's disease pathogenesis. **Biochimica Et Biophysica Acta. Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 10, p. 890–908, out. 2019.
- MENZA, M. et al. Treatment of insomnia in Parkinson's disease: a controlled trial of eszopiclone and placebo. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 11, p. 1708–1714, 15 ago. 2010.
- MILDE, S. et al. Inflammatory neuronal loss in the substantia nigra induced by systemic lipopolysaccharide is prevented by knockout of the P2Y6 receptor in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v. 18, n. 1, p. 225, 11 out. 2021.
- MORTIMORE, G. E. et al. Autophagy. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 27, p. 93–135, 1996.

- MOUGENOT, A.-L. J. et al. Transmission of prion strains in a transgenic mouse model overexpressing human A53T mutated α -synuclein. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 70, n. 5, p. 377–385, maio 2011.
- MUNOZ, C. et al. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 88, n. 5, p. 1747–1754, nov. 1991.
- MUSLIMOVIĆ, D. et al. Cognitive profile of patients with newly diagnosed Parkinson disease. **Neurology**, v. 65, n. 8, p. 1239–1245, 25 out. 2005.
- NAKAMURA, K. α -Synuclein and Mitochondria: Partners in Crime? **Neurotherapeutics**, v. 10, n. 3, p. 391–399, 1 jul. 2013.
- NANDIPATI, S.; LITVAN, I. Environmental Exposures and Parkinson's Disease. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 9, p. 881, set. 2016.
- NAPOLI, I.; NEUMANN, H. Microglial clearance function in health and disease. **Neuroscience**, v. 158, n. 3, p. 1030–1038, 6 fev. 2009.
- NASH, K. R. et al. Fractalkine Over Expression Suppresses α -Synuclein-mediated Neurodegeneration. **Molecular Therapy**, v. 23, n. 1, p. 17–23, 1 jan. 2015.
- NASROLAHI, A. et al. Neurotrophic factors hold promise for the future of Parkinson's disease treatment: is there a light at the end of the tunnel? **Reviews in the Neurosciences**, v. 29, n. 5, p. 475–489, 26 jul. 2018.
- NENNIG, S. E.; SCHANK, J. R. The Role of NF κ B in Drug Addiction: Beyond Inflammation. **Alcohol and Alcoholism (Oxford, Oxfordshire)**, v. 52, n. 2, p. 172–179, 9 mar. 2017.
- NGUYEN, L. T. N. et al. Role of NLRP3 Inflammasome in Parkinson's Disease and Therapeutic Considerations. **Journal of Parkinson's Disease**, v. 12, n. 7, p. 2117–2133, 2022.
- NIEHAUS, I.; LANGE, J. H. Endotoxin: is it an environmental factor in the cause of Parkinson's disease? **Occupational and Environmental Medicine**, v. 60, n. 5, p. 378–378, 1 maio 2003.
- NOMIYAMA, H.; OSADA, N.; YOSHIE, O. Systematic classification of vertebrate chemokines based on conserved synteny and evolutionary history. **Genes to Cells**, v. 18, n. 1, p. 1–16, 2013.
- NYU LANGONE HEALTH. **Natural History Study of Synucleinopathies**. Disponível em: <<https://beta.clinicaltrials.gov/study/NCT01799915>>. Acesso em: 20 jan. 2023.
- OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 32, n. 9, p. 1264–1310, set. 2017.
- OU, Z. et al. NLRP3 Inflammasome Inhibition Prevents α -Synuclein Pathology by Relieving Autophagy Dysfunction in Chronic MPTP-Treated NLRP3 Knockout Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 4, p. 1303–1311, abr. 2021.
- PARKKINEN, L.; PIRTTILÄ, T.; ALAFUZOFF, I. Applicability of current staging/categorization of alpha-synuclein pathology and their clinical relevance. **Acta Neuropathologica**, v. 115, n. 4, p. 399–407, abr. 2008.

PETROVITCH, H. et al. Plantation Work and Risk of Parkinson Disease in a Population-Based Longitudinal Study. **Archives of Neurology**, v. 59, n. 11, p. 1787–1792, 1 nov. 2002.

PHANI, S.; LOIKE, J. D.; PRZEDBORSKI, S. Neurodegeneration and Inflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 18, p. S207–S209, jan. 2012.

PIIRSALU, M. et al. Treatment With Lipopolysaccharide Induces Distinct Changes in Metabolite Profile and Body Weight in 129Sv and B16 Mouse Strains. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, 2020.

PISSADAKI, E.; BOLAM, J. P. The energy cost of action potential propagation in dopamine neurons: clues to susceptibility in Parkinson's disease. **Frontiers in Computational Neuroscience**, v. 7, 2013.

PITTS, M. W. Barnes Maze Procedure for Spatial Learning and Memory in Mice. **Bio-Protocol**, v. 8, n. 5, p. e2744, 5 mar. 2018.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 23 mar. 2017.

POHL, C.; DIKIC, I. Cellular quality control by the ubiquitin-proteasome system and autophagy. **Science (New York, N.Y.)**, v. 366, n. 6467, p. 818–822, 15 nov. 2019.

PONSEN, M. M. et al. Idiopathic hyposmia as a preclinical sign of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 56, n. 2, p. 173–181, ago. 2004.

POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 30, n. 12, p. 1591–1601, out. 2015.

PRANKE, I. M. et al. α -Synuclein and ALPS motifs are membrane curvature sensors whose contrasting chemistry mediates selective vesicle binding. **The Journal of Cell Biology**, v. 194, n. 1, p. 89–103, 11 jul. 2011.

PRATT, W. B. et al. **Targeting Hsp90/Hsp70-Based Protein Quality Control for Treatment of Adult Onset Neurodegenerative Diseases**. review-article. Disponível em: <<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124332>>. Acesso em: 20 fev. 2024.

PRZEDBORSKI, S.; VILA, M. The 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Mouse Model. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 991, n. 1, p. 189–198, 2003.

QUALMAN, S. J. et al. Esophageal Lewy bodies associated with ganglion cell loss in achalasia. Similarity to Parkinson's disease. **Gastroenterology**, v. 87, n. 4, p. 848–856, out. 1984.

RAMIREZ, A. E. et al. The Stimulatory Effects of Intracellular α -Synuclein on Synaptic Transmission Are Attenuated by 2-Octahydroisoquinolin-2(1H)-ylethanamine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 24, p. 13253, 9 dez. 2021.

RANSOHOFF, R. M.; LIU, L.; CARDONA, A. E. Chemokines and Chemokine Receptors: Multipurpose Players in Neuroinflammation. Em: **International Review of Neurobiology**. Neuroinflammation in Neuronal Death and Repair. [s.l.] Academic Press, 2007. v. 82p. 187–204.

- RAUNIO, A. et al. Lewy-related pathology exhibits two anatomically and genetically distinct progression patterns: a population-based study of Finns aged 85. **Acta Neuropathologica**, v. 138, n. 5, p. 771–782, nov. 2019.
- RENDÓN, W. O. et al. Golgi fragmentation is Rab and SNARE dependent in cellular models of Parkinson's disease. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 139, n. 5, p. 671–684, 1 maio 2013.
- RIOS, R. M.; BORNENS, M. The Golgi apparatus at the cell centre. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 15, n. 1, p. 60–66, 1 fev. 2003.
- ROCHA-FERREIRA, E. et al. The role of different strain backgrounds in bacterial endotoxin-mediated sensitization to neonatal hypoxic-ischemic brain damage. **Neuroscience**, v. 311, p. 292–307, 17 dez. 2015.
- RODINA, A. et al. The epichaperome is an integrated chaperome network that facilitates tumour survival. **Nature**, v. 538, n. 7625, p. 397–401, out. 2016.
- RODRIGUES E SILVA, A. M. et al. Who was the man who discovered the “Lewy bodies”? **Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society**, v. 25, n. 12, p. 1765–1773, 15 set. 2010.
- ROGERS, T. T. et al. Structure and deterioration of semantic memory: a neuropsychological and computational investigation. **Psychological Review**, v. 111, n. 1, p. 205–235, jan. 2004.
- RON, D.; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 7, p. 519–529, jul. 2007.
- RUBINSZTEIN, D. C. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration. **Nature**, v. 443, n. 7113, p. 780–786, 19 out. 2006.
- RUTLEDGE, B. S.; CHOY, W.-Y.; DUENNWALD, M. L. Folding or holding?—Hsp70 and Hsp90 chaperoning of misfolded proteins in neurodegenerative disease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 298, n. 5, 1 maio 2022.
- SA, B. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, abr. 2009.
- SAMPSON, T. R. et al. Gut Microbiota Regulate Motor Deficits and Neuroinflammation in a Model of Parkinson's Disease. **Cell**, v. 167, n. 6, p. 1469–1480.e12, 1 dez. 2016.
- SASAKI, K.; YOSHIDA, H. Organelle autoregulation—stress responses in the ER, Golgi, mitochondria and lysosome. **The Journal of Biochemistry**, v. 157, n. 4, p. 185–195, 1 abr. 2015.
- SAVI, F. F. et al. What animal models can tell us about long-term cognitive dysfunction following sepsis: A systematic review. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 124, p. 386–404, 1 maio 2021.
- SAVICA, R.; BOEVE, B. F.; MIELKE, M. M. When Do α -Synucleinopathies Start? An Epidemiological Timeline: A Review. **JAMA neurology**, v. 75, n. 4, p. 503–509, 1 abr. 2018.
- SCHMIDT, N.; FERGER, B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. **Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria: 1996)**, v. 108, n. 11, p. 1263–1282, 2001.

SEEMANN, S.; ZOHLES, F.; LUPP, A. Comprehensive comparison of three different animal models for systemic inflammation. **Journal of Biomedical Science**, v. 24, n. 1, p. 60, 24 ago. 2017.

SHARMA, B. R.; KANNEGANTI, T.-D. NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. **Nature Immunology**, v. 22, n. 5, p. 550–559, maio 2021.

SILVA, S. et al. Estudos de custo da Doença de Parkinson no Brasil: uma lacuna científica evidente. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e214101522457, 24 nov. 2021.

SLITER, D. A. et al. Parkin and PINK1 mitigate STING-induced inflammation. **Nature**, v. 561, n. 7722, p. 258–262, set. 2018.

SMITH, J. K.; MELLICK, G. D.; SYKES, A. M. The role of the endolysosomal pathway in α -synuclein pathogenesis in Parkinson's disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 16, 2023.

SOARES, J. J. et al. Paraquat exposure-induced Parkinson's disease-like symptoms and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Neuroprotective effect of *Bougainvillea glabra* Choisy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 95, p. 245–251, 1 nov. 2017.

Sociability and Social Novelty Test. Stanford. Disponível em: <<https://med.stanford.edu/sbfnl/services/bm/si/three-chamber.html>>. Acesso em: 1 mar. 2024.

SORRENTINO, Z. A. et al. Motor neuron loss and neuroinflammation in a model of α -synuclein-induced neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 120, p. 98–106, dez. 2018.

STIASNY-KOLSTER, K. et al. Combination of “idiopathic” REM sleep behaviour disorder and olfactory dysfunction as possible indicator for alpha-synucleinopathy demonstrated by dopamine transporter FP-CIT-SPECT. **Brain: A Journal of Neurology**, v. 128, n. Pt 1, p. 126–137, jan. 2005.

STOKHOLM, M. G. et al. Pathological α -synuclein in gastrointestinal tissues from prodromal Parkinson disease patients. **Annals of Neurology**, v. 79, n. 6, p. 940–949, jun. 2016.

SUBBARAYAN, M. S. et al. CX3CL1/CX3CR1 signaling targets for the treatment of neurodegenerative diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 231, p. 107989, 1 mar. 2022.

SULZER, D. et al. T cells from patients with Parkinson's disease recognize α -synuclein peptides. **Nature**, v. 546, n. 7660, p. 656–661, jun. 2017.

SULZER, D.; EDWARDS, R. H. The physiological role of α -synuclein and its relationship to Parkinson's Disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 150, n. 5, p. 475–486, 2019.

SURMEIER, D. J. Determinants of dopaminergic neuron loss in Parkinson's disease. **The FEBS Journal**, v. 285, n. 19, p. 3657–3668, 2018.

SVENNINGSSON, P. et al. Cognitive impairment in patients with Parkinson's disease: diagnosis, biomarkers, and treatment. **The Lancet. Neurology**, v. 11, n. 8, p. 697–707, ago. 2012.

SVENSSON, E. et al. Vagotomy and subsequent risk of Parkinson's disease. **Annals of Neurology**, v. 78, n. 4, p. 522–529, out. 2015.

SWANSON, K. V.; DENG, M.; TING, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. **Nature Reviews. Immunology**, v. 19, n. 8, p. 477–489, ago. 2019.

TANIK, S. A. et al. Lewy Body-like α -Synuclein Aggregates Resist Degradation and Impair Macroautophagy * \blacklozenge . **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 21, p. 15194–15210, 24 maio 2013.

TANSEY, M. G. et al. Inflammation and immune dysfunction in Parkinson disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 22, n. 11, p. 657–673, nov. 2022.

THIBAudeau, T. A.; ANDERSON, R. T.; SMITH, D. M. A common mechanism of proteasome impairment by neurodegenerative disease-associated oligomers. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1097, 15 mar. 2018.

TSENG, B. P. et al. Abeta inhibits the proteasome and enhances amyloid and tau accumulation. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 11, p. 1607–1618, nov. 2008.

TULVING, E. Episodic memory and common sense: how far apart? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 356, n. 1413, p. 1505–1515, 29 set. 2001.

URYU, K. et al. Convergence of Heat Shock Protein 90 with Ubiquitin in Filamentous α -Synuclein Inclusions of α -Synucleinopathies. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 3, p. 947–961, 1 mar. 2006.

VAN DEN BERGE, N. et al. Evidence for bidirectional and trans-synaptic parasympathetic and sympathetic propagation of alpha-synuclein in rats. **Acta Neuropathologica**, v. 138, n. 4, p. 535–550, out. 2019.

VARGAS, A. P. et al. Disability and use of healthcare resources in Brazilian patients with Parkinson's disease. **Disability and Rehabilitation**, v. 30, n. 14, p. 1055–1062, 1 jan. 2008.

VELSEBOER, D. C. et al. Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 17, n. 10, p. 724–729, 1 dez. 2011.

VICARIO-ABEJÓN, C. et al. Role of neurotrophins in central synapse formation and stabilization. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 965–974, dez. 2002.

VILLAR-PIQUÉ, A.; LOPES DA FONSECA, T.; OUTEIRO, T. F. Structure, function and toxicity of alpha-synuclein: the Bermuda triangle in synucleinopathies. **Journal of Neurochemistry**, v. 139 Suppl 1, p. 240–255, out. 2016.

VOLPICELLI-DALEY, L. A. et al. Formation of α -synuclein Lewy neurite-like aggregates in axons impedes the transport of distinct endosomes. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 25, p. 4010–4023, 15 dez. 2014.

VON CAMPENHAUSEN, S. et al. Costs of illness and care in Parkinson's Disease: An evaluation in six countries. **European Neuropsychopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 180–191, fev. 2011.

WAKABAYASHI, K. et al. The Lewy Body in Parkinson's Disease and Related Neurodegenerative Disorders. **Molecular Neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 495–508, 1 abr. 2013.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science (New York, N.Y.)**, v. 334, n. 6059, p. 1081–1086, 25 nov. 2011.

WANG, T.; HAY, J. C. Alpha-synuclein Toxicity in the Early Secretory Pathway: How It Drives Neurodegeneration in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, 2015.

WANG, X. et al. Pathogenic alpha-synuclein aggregates preferentially bind to mitochondria and affect cellular respiration. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 7, n. 1, p. 41, 14 mar. 2019.

WATANABE, Y.; TAGUCHI, K.; TANAKA, M. Ubiquitin, Autophagy and Neurodegenerative Diseases. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2022, set. 2020.

WAY, S. W.; POPKO, B. Harnessing the integrated stress response for the treatment of multiple sclerosis. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 4, p. 434–443, 1 abr. 2016.

WEI, Y. et al. The function of Golgi apparatus in LRRK2-associated Parkinson's disease. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 16, 2023.

Wire Hanging Test. Disponível em:

<<https://qpsneuro.com/in-vivo-services/behavioral-tests/motor-ability-tests/wire-hanging-test/>>.

Acesso em: 23 jul. 2023.

WU, N. et al. Alpha-synuclein overexpression in mice alters synaptic communication in the corticostriatal pathway. **Journal of Neuroscience Research**, v. 88, n. 8, p. 1764–1776, jun. 2010.

XIA, C.; POSTUMA, R. B. Diagnosing multiple system atrophy at the prodromal stage. **Clinical Autonomic Research**, v. 30, n. 3, p. 197–205, 1 jun. 2020.

XIA, Y. et al. Characterization of the human α -synuclein gene: Genomic structure, transcription start site, promoter region and polymorphisms. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 3, n. 5, p. 485–494, 1 jan. 2001.

YAMADA, K.; IWATSUBO, T. Extracellular α -synuclein levels are regulated by neuronal activity. **Molecular Neurodegeneration**, v. 13, n. 1, p. 9, 22 fev. 2018.

YANG, W.; LI, S.; LI, X.-J. A CRISPR monkey model unravels a unique function of PINK1 in primate brains. **Molecular Neurodegeneration**, v. 14, n. 1, p. 17, 2 maio 2019.

YE, H. et al. Genetics and Pathogenesis of Parkinson's Syndrome. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, n. 1, p. 95–121, 2023.

YUAN, J. et al. Overexpression of β -NGF promotes differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into neurons through regulation of AKT and MAPK pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 383, n. 1–2, p. 201–211, nov. 2013.

ZAKARIA, R. et al. Lipopolysaccharide-Induced Memory Impairment in Rats: a Model of Alzheimer's Disease. **Physiological Research**, p. 553–565, 31 ago. 2017.

ZHAN, Y. et al. Deficient neuron-microglia signaling results in impaired functional brain connectivity and social behavior. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 3, p. 400–406, mar. 2014.

ZHANG, F.-X.; XU, R.-S. Juglanin ameliorates LPS-induced neuroinflammation in animal models of Parkinson's disease and cell culture via inactivating TLR4/NF- κ B pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 97, p. 1011–1019, 1 jan. 2018.

ZHANG, J. et al. Intrapallidal lipopolysaccharide injection increases iron and ferritin levels in glia of the rat substantia nigra and induces locomotor deficits. **Neuroscience**, v. 135, n. 3, p. 829–838, 2005.

ZHANG, P.-F.; GAO, F. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a meta-analysis of PET imaging studies. **Journal of Neurology**, v. 269, n. 5, p. 2304–2314, 1 maio 2022.

ZHARIKOV, A. D. et al. shRNA targeting α -synuclein prevents neurodegeneration in a Parkinson's disease model. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 7, p. 2721–2735, 1 jul. 2015.

ZHU, B. et al. The immunology of Parkinson's disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 44, n. 5, p. 659–672, 1 set. 2022.

11 APÊNDICES

RESULTADOS SUPLEMENTARES

Testes Comportamentais

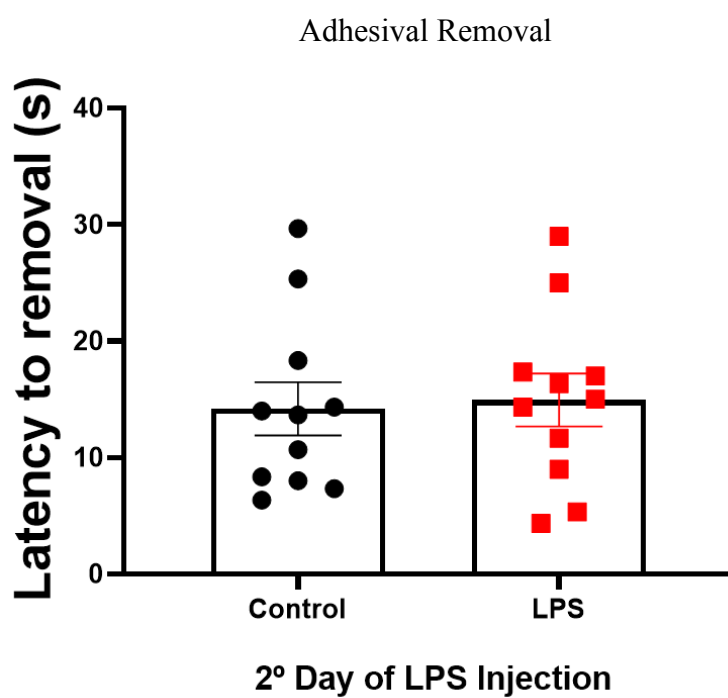
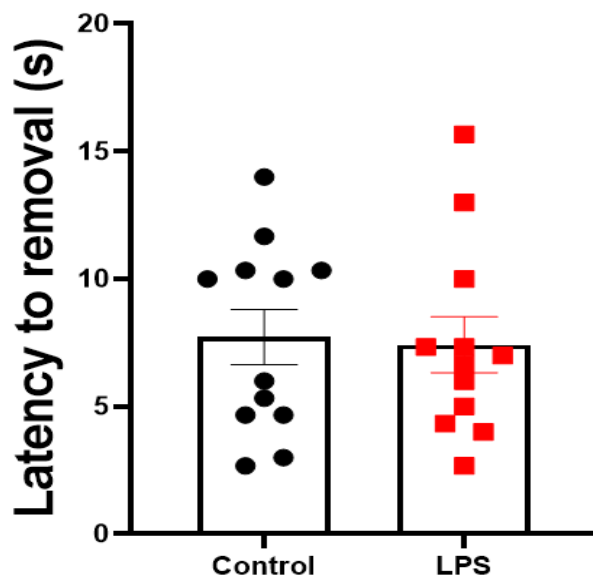


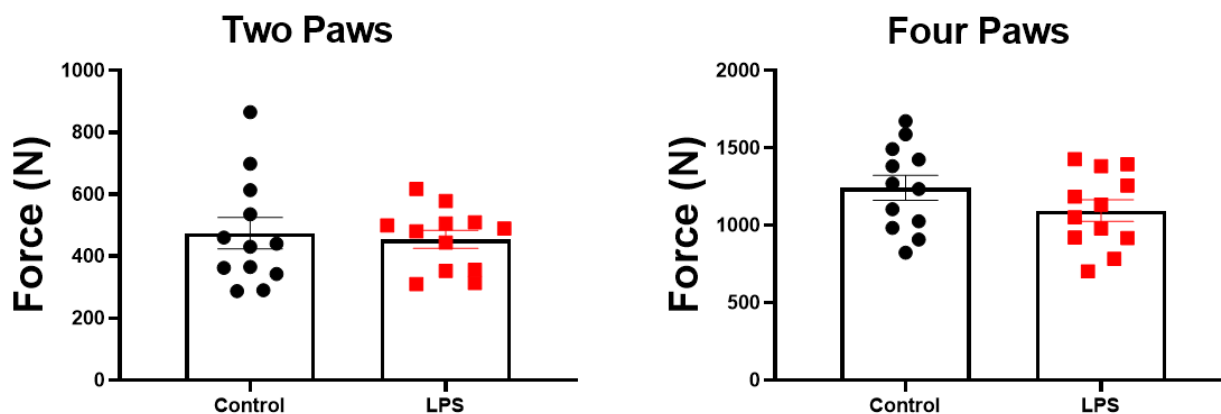
Gráfico 48 - Teste de Remoção de Adesivo de Ponta Nasal para detecção de alteração na coordenação motora fina realizado no 2º dia de indução. (N= 11).



1 Day Post-LPS Injection (DPI)

Gráfico 49 - Teste de Remoção de Adesivo de Ponta Nasal para detecção de alteração na coordenação motora fina realizado no 1º dpi. (N= 12).

Grip Force



7º Day of LPS Injection

Gráfico 50 - Grip Force Test aplicado para avaliar alteração da força de tração dos animais, teste realizado no 7º dia de indução. (N= 12).

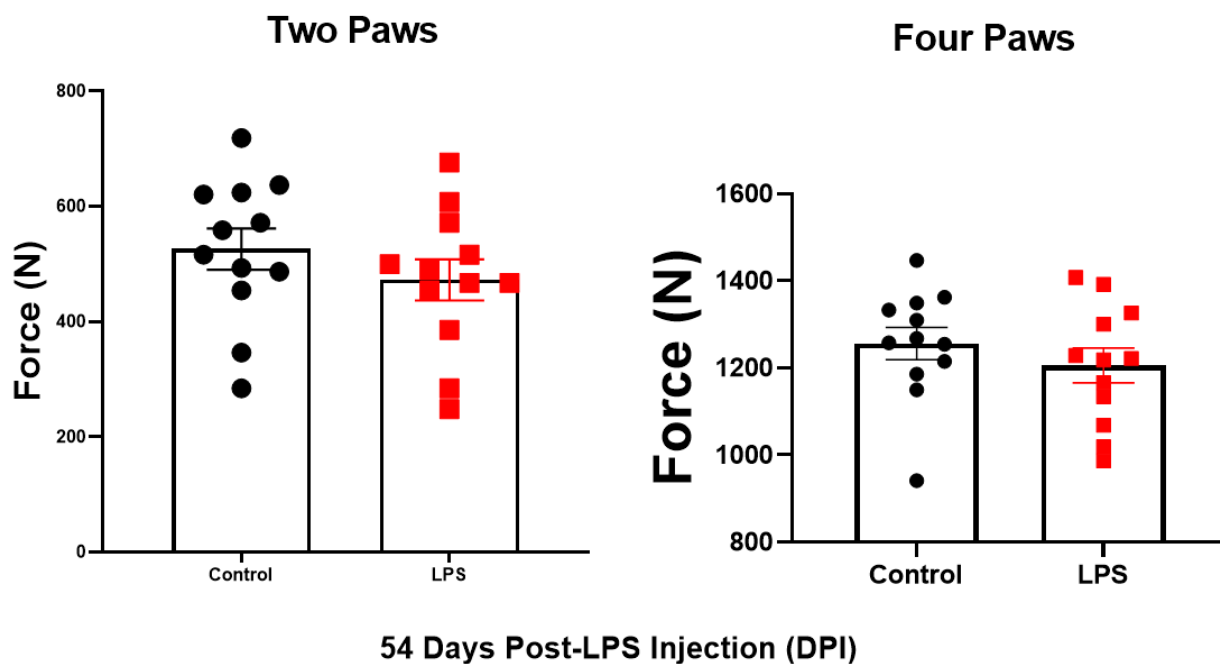


Gráfico 51 - Grip Force Test aplicado para avaliar alteração da força de tração dos animais, teste realizado no 54º dpi.

Wire Hang

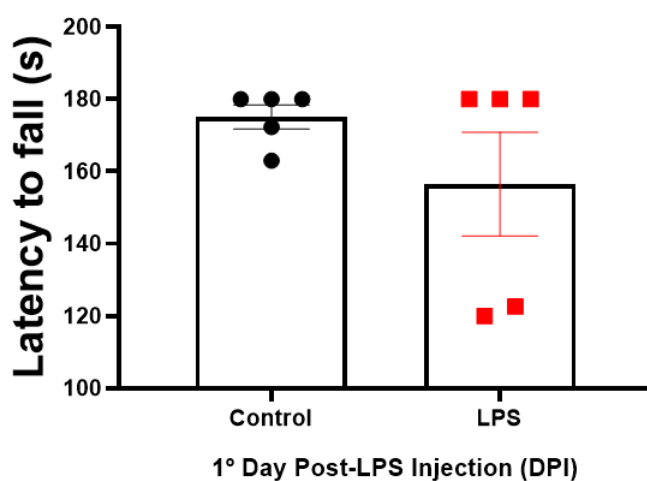


Gráfico 52 - Wire Hang Test aplicado no 1º dpi para detectar anormalidades musculares. (N= 5).

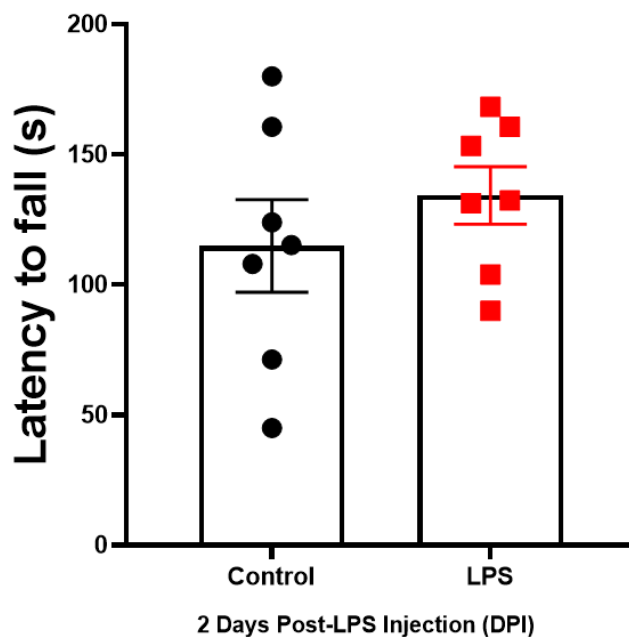


Gráfico 53 - Wire Hang Test aplicado no 2º dpi para detectar possíveis anormalidades neuromusculares de força muscular nos animais. (N= 7).

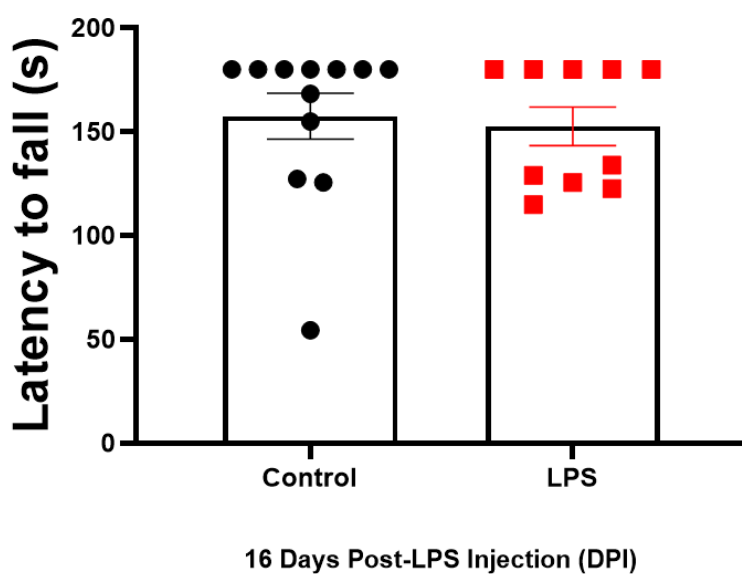
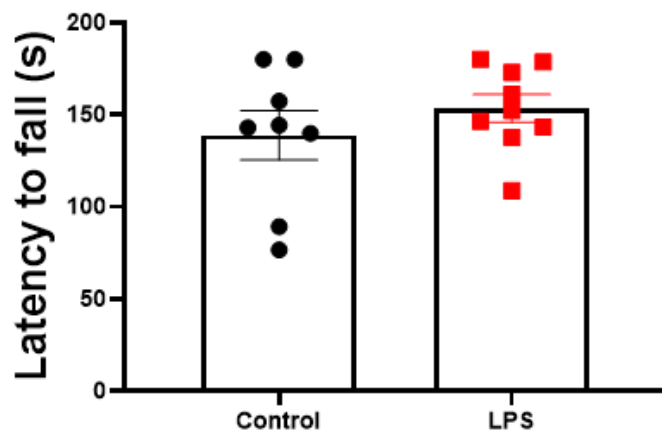


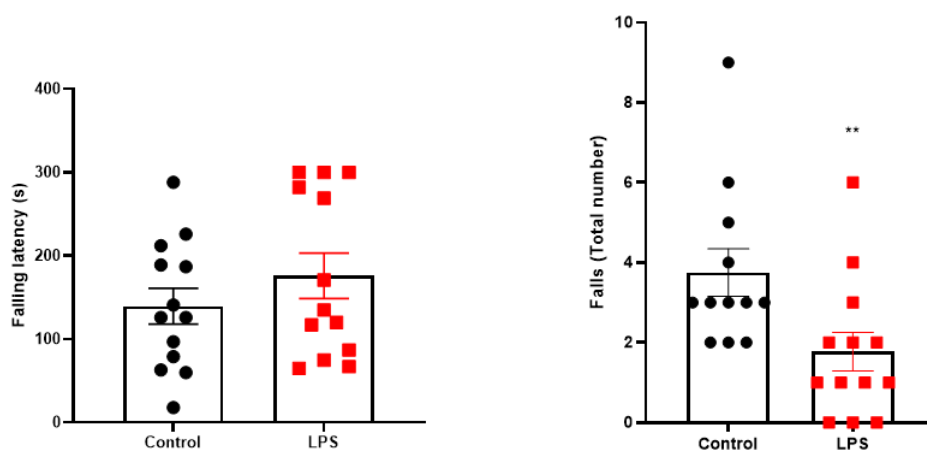
Gráfico 54 - Wire Hang Test aplicado no 16º dpi para detectar possíveis anormalidades neuromusculares de força muscular nos animais. (N= 10-12).



54 Days Post-LPS Injection (DPI)

Gráfico 55 - Wire Hang Test aplicado no 54º dpi para detectar possíveis anormalidades neuromusculares de força muscular nos animais. (N= 8-9).

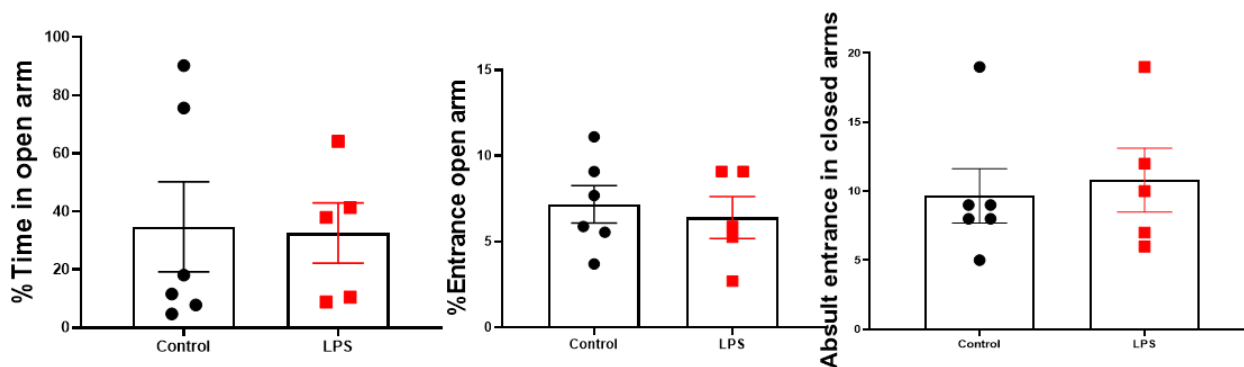
Rotarod



4 Days Post-LPS Injection (DPI)

Gráfico 56 - Teste Rotarod para avaliar coordenação motora aplicado no 4º dpi. (N= 12-13).

Elevated Plus Maze



36 Days Post-LPS Injection (DPI)

Gráfico 57 - Teste do Labirinto em Cruz elevado para avaliação de comportamento do tipo ansioso com 36 dpi. (N= 5-6).

Marble Buried

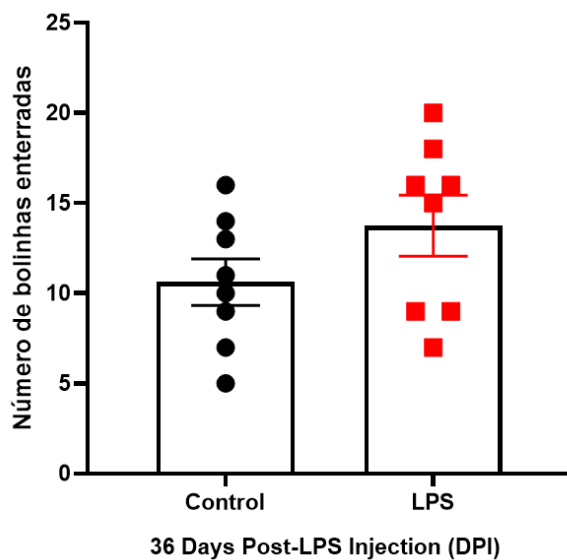
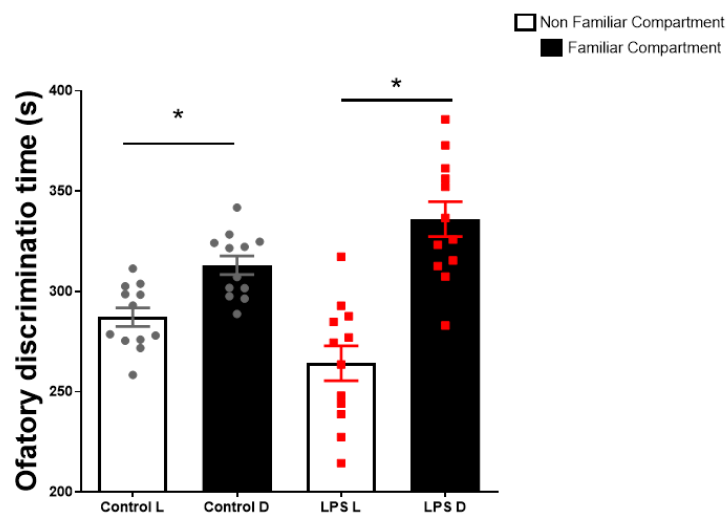


Gráfico 58 - Teste Marble Buried para avaliar comportamentos do tipo ansioso e compulsivo nos animais com 36 dpi. (N= 8).

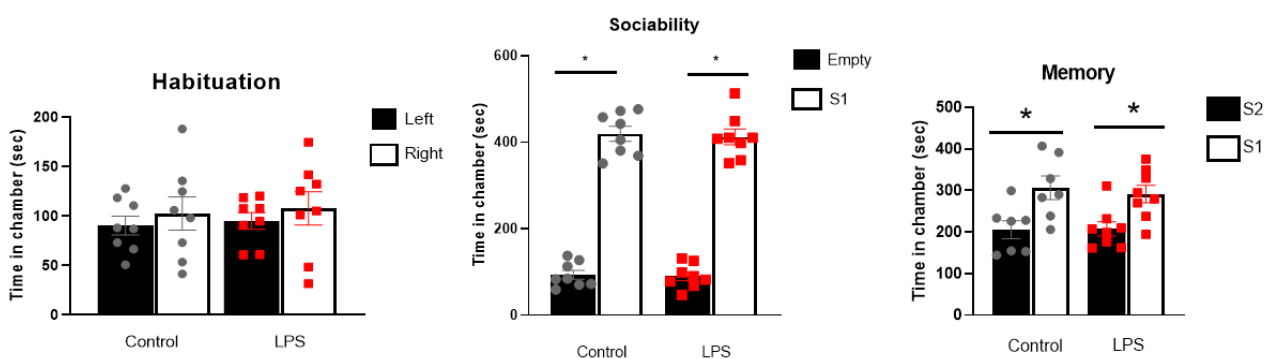
Olfactory discrimination



37 Days Post-LPS Injection (DPI)

Gráfico 59 - Teste de discriminação olfativa para avaliar perda de olfato nos animais com 37 dpi. (N= 12).

Social Recognition Memory



38 Days Post-LPS Injection (DPI)

Gráfico 60 - Teste de Reconhecimento Social de Três Câmaras para explorar a sociabilidade dos animais com 38 dpi. (N= 8-9).

Simple inhibitory avoidance

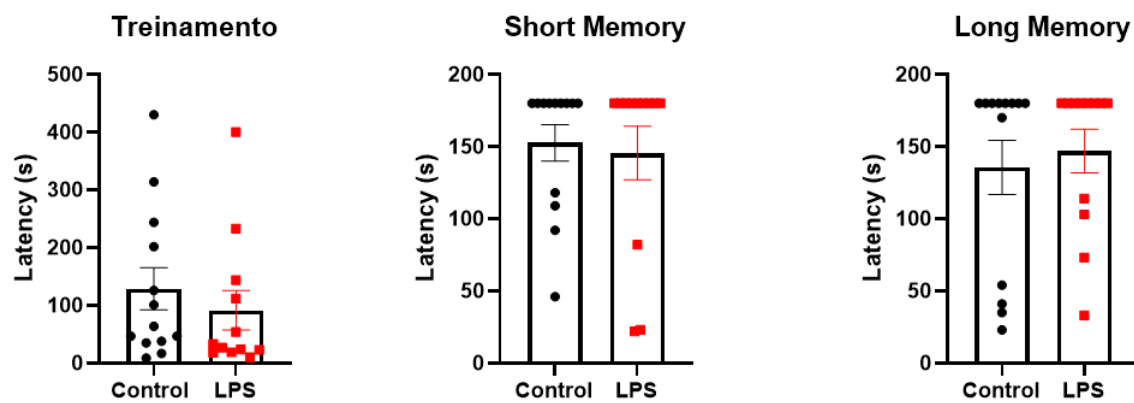
**23 Days Post-LPS Injection (DPI)**

Gráfico 61 - Teste da Esquiva Inibitória para avaliar memória associada a amígdala. (N= 4-12).

12 ANEXO

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

Prezado(a):

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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 UFGM

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