

Renan Florindo Amorim

**MODELO EXPERIMENTAL DE FASE PRÉ CLÍNICA DA DOENÇA DE
PARKINSON POR INFUSÃO INTRANASAL COM 1-METIL-4-FENIL-
1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDINA EM CAMUNDONGO:
ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO MESENCÉFALO
VENTRAL E NÚCLEO ESTRIADO**

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2016

Renan Florindo Amorim

**MODELO EXPERIMENTAL DE FASE PRÉ CLÍNICA DE DOENÇA DE
PARKINSON POR INFUSÃO INTRANASAL COM 1-METIL-4-FENIL-
1,2,3,6-TETRAHIDROPIRIDINA EM CAMUNDONGO:
ANÁLISE ESTRUTURAL E FUNCIONAL DO MESENCÉFALO
VENTRAL E NÚCLEO ESTRIADO**

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

Orientadora: Prof^ª. Elizabeth Ribeiro da Silva.

Colaboradores: Prof^ª Dr^ª Aline Silva de Miranda, Dr. Rodrigo Novaes Ferreira, Bruna da Silva Oliveira.

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2016

043 Amorim, Renan Florindo.
Modelo experimental de fase pré-clínica de doença de Parkinson por infusão intranasal com 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina em camundongo: análise estrutural e funcional do mesencéfalo ventral e núcleo estriado [manuscrito] / Renan Florindo Amorim. - 2016.

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

Orientadora: Prof^a. Elizabeth Ribeiro da Silva. Colaboradores: Prof^a Dr^a Aline Silva de Miranda, Dr. Rodrigo Novaes Ferreira, Bruna da Silva Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Neurociências - Teses. 2. Parkinson, Doença de - Teses. I. Silva, Elizabeth Ribeiro da. II. Miranda, Aline Silva de. III. Ferreira, Rodrigo Novaes. IV. Oliveira, Bruna da Silva. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. VI. Título.

CDU: 612.8

EPÍGRAFE

"Donde no puedas amar, no te demores."

Frida Kahlo

AGRADECIMENTOS

A pessoa que mais admiro nesta vida, que não mediu esforços para educar meus irmãos e a mim, e nos formar homens com caráter, minha Mãe, dedico-lhe todas as minhas conquistas, obrigado por todos os seus conselhos, e que eu consiga ser para meus filhos ao menos um pouco do que a senhora é para mim.

Aos meus irmãos, Raphael e Rogerio, e ao meu Pai. Obrigado pelo companheirismo, mesmo estando longe, sei que o amor que temos uns pelos outros é recíproco e verdadeiro.

Rodrigo Lara, Dona Dorinha e família. Grato por toda hospitalidade mineira! Realmente me sinto parte da família de vocês. Obrigado por toda atenção, paciência e carinho que tiveram comigo, o apoio de vocês, com toda certeza, foi fundamental para que eu conseguisse atingir esse objetivo!

Camilla Moreira, Lucas Almeida e Rinaldo Jr, meus amigos/irmãos! Obrigado por dividir as alegrias, a caminhada e as contas! Amo vocês, são verdadeiros presentes.

Aos amigos do Laboratório Conceição Machado, a compreensão, a amizade, o incentivo, o companheirismo, foram únicos. Grato por cada momento vivido nesse laboratório, ao lado de vocês.

A orientadora prof^a. Elizabeth Ribeiro, por aceitar me orientar, por ter acreditado em meu potencial. Por ter auxiliado em meu crescimento profissional. Por ter me apresentado o complexo e apaixonante estudo sobre Doença de Parkinson, entre tantos outros da Neurociência e Biologia Celular. Muito obrigado.

Aos colaboradores Prof^a Aline Silva de Miranda, Dr. Rodrigo Novaes Ferreira e Bruna da Silva Oliveira, por todo aprendizado, ajudada, companheirismo e pela amizade.

A prof^a. Patrícia, por estar sempre disposta a nos ouvir de forma justa e ética, grato por todos os momentos que auxiliou meus colegas e a mim. E aos demais professores do Laboratório Conceição Machado.

Ao prof. Rui Prediger, prof^a. Leda Quércia, prof. Antônio Lúcio Teixeira e prof. Cândido que se dispuseram a colaborar com nossos trabalhos.

Aos funcionários do Centro de Microscopia da UFMG pelo profissionalismo e agilidade, além da atenção, disponibilidade e paciência ao me ensinar todas as etapas de processamento de material até a obtenção de imagens no Microscópio Eletrônico de Transmissão.

Aos amigos Cinthia Vila Nova Santana, doutoranda do programa de Genética, UFMG, Emanuel Henrique Gonçalves Querino, mestrando em Medicina Molecular, UFMG, e a Prof^a Dr^a Luiza Conceição Amorim Martins, adjunta I PUC Minas, por estarem sempre em prontidão para me auxiliar nas correções da dissertação e sugerir novos pontos de vista.

Aos amigos da Empresa “Farmácias Pague Menos”, que me deram forças para acreditar em meu trabalho, e aos tantos amigos que fiz em Belo Horizonte.

A CAPES por acreditar no desenvolvimento científico e crescimento pessoal.

LISTA DE ABREVIATURAS

DP - Doença de Parkinson

SNpc - *Substantia Nigra pars compacta*

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

MAO-B – Monoaminoxidase-B

MPP + - 1-metil-4-phenylpyridinium

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

NMDA - N-metil-D-aspartato

ERNs - Espécies Reativas de Nitrogênio

ONS - Óxido Nítrico Sintase

ON - Óxido Nítrico

SUP - Sistema Ubiquitina-Proteassoma

TH + - Tirosina Hidroxilase-positivas

CL - Corpos de Lewy

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Neuropatologia da DP.....	<u>1615</u>
Figura 2: Processo de envelhecimento incorreto da alfa-sinucleína.....	<u>1918</u>
Figura 3 Ilustração esquemática das possíveis rotas de passagem de xenobióticos e drogas através de administração intranasal.....	<u>2423</u>
Figura 4: Ilustração esquemática de vias metabólicas do MPTP no sistema nervoso central	<u>2524</u>
Figura 5: Esquema da administração intranasal de MPTP (1mg/narina) em camundongo.	<u>2928</u>
Figura 6: Teste de Campo Aberto com animais controles (N=04) e submetidos à infusão intranasal de MPTP (N=04)..	<u>3332</u>
Figura 7: Níveis de BDNF e de NGF no mesencéfalo ventral de animais controles (N=04) e de animais submetidos à infusão intrasal com MPTP (N=04).....	<u>3433</u>
Figura 8: Níveis de BDNF e de NGF no núcleo estriado de animais controles (N=04) e de animais submetidos à infusão intrasal com MPTP (N=04).....	<u>3433</u>
Figura 9: Níveis de citocinas no mesencéfalo ventral de animais controles (N=06) e submetidos à infusão com MPTP (N=06).....	<u>3534</u>
Figura 10: Níveis de citocinas no núcleo estriado de animais controles (N=06) e submetidos à infusão com MPTP (N=06).	<u>3635</u>
Figura 11: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de salina.....	37
Figura 12: Ultraestrutura do mesencéfalo ventral de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de salina.....	39
Figura 13: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de MPTP.....	41
Figura14: Ultraestrutura do mesencéfalo ventral de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de MPTP.....	43
Figura 15: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos Knock out (KO P55) mortos 11 dias após infusão de salina. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, sem alterações estruturais.....	45
Figura 16: Ultraestrutura do Mesencéfalo Ventral de camundongos Knock out (KO P55) mortos 11 dias após infusão de salina.....	47
Figura 17: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos Knock out (KOP55) mortos 11 dias após infusão MPTP.....	49
Figura 18: Ultraestrutura do Mesencéfalo Ventral de camundongos Knock out (KO p55) mortos 11 dias após infusão MPTP.....	51
Figura 19: Ultraestrutura do Mesencéfalo Ventral de camundongos Knock out (KO p55) mortos 11 dias após infusão MPTP.....	53

RESUMO

A Doença de Parkinson (DP) é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível que tem como principal característica histopatológica a morte de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc, *substantia nigra pars compacta*) no mesencéfalo. Os sintomas clássicos da DP tidos como sinais cardinais e determinantes para o diagnóstico são: bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural. A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente em humanos, a etiologia da DP ainda não está totalmente esclarecida e pode envolver diversos fatores tais como genéticos, senescência, estresse oxidativo, disfunções mitocondriais, neuroinflamação e exposição a toxinas ambientais. Nesse trabalho, avaliamos a atividade motora, os níveis de fatores neurotróficos e citocinas, assim como possíveis alterações ultraestruturais no mesencéfalo ventral e núcleo estriado de camundongos C57BL/6 submetidos à infusão intranasal de MPTP. Nossos resultados revelaram que aos 11 dias pós-infusão intranasal de MPTP (1 mg/narina), não houve alteração na capacidade locomotora desses animais. No entanto, os animais apresentaram padrão de comportamento característico de ansiedade no teste de campo aberto. Nesse mesmo período, observou-se aumento dos níveis de IL-10 e IL-17 no mesencéfalo ventral e de IL-17 no núcleo estriado. Em relação aos fatores neurotróficos, observou-se diminuição dos níveis de BDNF no mesencéfalo ventral e aumento dos níveis de BDNF e NGF no núcleo estriado. A análise ultraestrutural do mesencéfalo ventral e da substância negra não revelou alterações significativas aos 11 dias pós-infusão. Dados preliminares obtidos com camundongos KO p55 TNF aos 11 dias após infusão com MPTP mostram alterações degenerativas em neurônios do mesencéfalo ventral e do núcleo estriado aos 11 dias pós-infusão. Nossos resultados indicam que o modelo utilizado pode ser associado à fase pré-clínica da DP e abre novas perspectivas para estudo de fatores que interferem com o desenvolvimento dessa doença.

Palavras-chave: MPTP, Parkinson, BDNF, NGF, Citocinas.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a progressive and irreversible neurodegenerative disease whose main histopathologic characteristic is the death of dopaminergic neurons in the compact part of the substantia nigra (SNpc, *substantia nigra pars compacta*) in the midbrain. The classic symptoms of PD taken as cardinal and decisive for diagnosis are: bradykinesia, rigidity, resting tremor and postural instability. It is the second most common neurodegenerative disease in humans and, according to the data of the Associação Brasileira de Parkinson (Brazilian Parkinson's Association), there are over 200,000 affected Brazilians. The etiology of PD has not been fully understood yet and may involve various factors such as genetic factors, senescence, oxidative stress, mitochondrial dysfunction, neuroinflammation and exposure to environmental toxins. In this work, we evaluate the locomotor activity, the levels of neurotrophic factors and cytokines as well as the ultrastructural alterations in the ventral midbrain and the striatum of C57BL/6 mice after intranasal infusion of MPTP. Our results showed that at the 11th day post-infusion of MPTP (1mg/nostril) it was not possible to observe any alteration in locomotor ability of those animals. However, the mice exhibited a pattern of anxious behavior in open field test. At the same period post infusion, it was possible to detect increased levels of IL-10 and IL-17 in the ventral midbrain, and IL-17 in the striatum. Concerning neurotrophic factors, we have observed decreased levels of BDNF in the ventral midbrain, and increased BDNF and NGF levels in the striatum. Ultrastructural analyses of the ventral midbrain and striatum have not revealed any significant morphologic alteration. Preliminary results with KO p55 TNF at day 11th post infusion of MPTP showed degenerative changes in the neurons of ventral midbrain and striatum. Our results indicate that the experimental model might be associated to the preclinical phase of PD and open new perspectives for studying the factors that might interfere with the progression of this disease. Therefore, this model mimics pre-clinical symptoms of PD.

Keywords: MPTP, Parkinson, BDNF, NGF, Cytokines.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1214
1.1 Aspectos Gerais sobre a Doença de Parkinson	1214
1.1.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson	1312
1.1.2 Etiopatogenia da Doença de Parkinson	1544
1.1.3 Neuroinflamação e Doença de Parkinson	1948
1.2 Modelos experimentais de Doença de Parkinson	2224
1.2.1 Modelo experimental de doença de Parkinson por administração de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina – MPTP.....	2322
2 JUSTIFICATIVA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	2625
3 OBJETIVOS	2726
3.1 Objetivo geral.....	2726
3.2 Objetivos Específicos.....	2726
4 MATERIAL E MÉTODOS	2827
4.1 Animais	2827
4.2 Administração intranasal de 1-Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina	2827
4.3 Avaliação de atividade locomotora em Teste de Campo Aberto (Open Field Test)	3029
4.4 Dosagem de fatores neurotróficos e de citocinas	3130
4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	3231
4.6 Análise Estatística	3231
5 RESULTADOS	3332
5.1 Sinais pré-clínicos em modelo experimental de doença de Parkinson após infusão intranasal de MPTP	3332
5.2 Níveis de fatores neurotróficos em mesencéfalo ventral e núcleo estriado ...	3433
5.3 Níveis de citocinas em mesencéfalo ventral e núcleo estriado.....	3534
5.4 Alterações ultraestruturais no Núcleo Estriado e Mesencéfalo Ventral	3736
6 DISCUSSÃO	5655
7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS	5958
8 REFERÊNCIAS	6059

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais sobre a Doença de Parkinson

A Doença de Parkinson (DP), descrita pela primeira vez em 1817 por James Parkinson em sua monografia intitulada *An essay on the shaking palsy* – Um ensaio sobre a paralisia agitante – é caracterizada clinicamente por tremor de repouso, bradicinesia (lentidão dos movimentos), postura encurvada para frente e marcha festinante (Parkinson, 1817, republicado em 2002).

Posteriormente, Charcot (1872) cunhou o nome “La maladie de Parkinson”, em reconhecimento ao trabalho de James Parkinson. No final do século XIX e início do XX, Charcot já havia caracterizado os quatro sinais cardinais da doença de Parkinson, os sintomas associados - disartria, disfagia e as alterações autonômicas, e proposto o primeiro tratamento farmacológico para a doença (Teive, 1998). A associação dos sintomas clínicos com a alteração de neurônios da substância negra (SN) do mesencéfalo ventral foi proposta por Brissau (1925). Posteriormente, Greenfield e Bosanquee, em 1953, descreveram o comprometimento de outras áreas cerebrais na DP (Goetz, 2011).

Os sintomas clássicos da DP tidos como cardinais e determinantes para o diagnóstico são: bradicinesia, rigidez, tremor de repouso e instabilidade postural (Jankovic, 2008). Alterações de locomoção são sinais primários da DP (King & Horak, 2009; Kwakkel et al., 2007) aliadas e agravadas pelos envelhecimento, imobilidade e desuso muscular (Giladi, 2009). Os primeiros sintomas da DP aparecem quando cerca de 60-70% das células dopaminérgicas tirosina hidroxilase-positivas (TH-positivas) da SNpc são degeneradas (Przedborski, 2000). A SNpc desempenha papel importante no controle de movimentos ao projetar seus axônios dopaminérgicos excitatórios para o córtex motor primário e modulatórios para o estriado, um dos núcleos da base envolvido com movimento voluntário, automático e aprendizagem (Keath et al., 2007).

Recentemente foi reconhecido que os indivíduos podem apresentar uma variedade de sintomas neurológicos e psiquiátricos, incluindo a constipação, diminuição do olfato, distúrbios do sono, dor, depressão e transtornos de ansiedade, que começam cinco e, em alguns casos, até 20 anos antes de os déficits motores clássicos de PD serem aparentes (Ferrer et al, 2011; Savica et al, 2010).

Os distúrbios de ansiedade são altamente prevalentes na doença de Parkinson, afetando até metade dos pacientes (Gallagher & Schrag, 2012). A ansiedade crônica está fortemente associada ao desenvolvimento de depressão, que afeta aproximadamente um terço

dos pacientes com Parkinson, com tal gravidade que justifica a intervenção clínica (Reijnders et al., 2008).

Bem como outros sintomas não motores, a hiposmia tipicamente precede a deficiência motora na DP. As deficiências afetam todas as áreas de olfação, incluindo identificação e discriminação de odores e sensibilidade reduzida (Doty, 2012a, b). Apesar de apenas um em cada quatro pacientes com Parkinson reconhecer o mau senso de cheiro em questionários auto-relatados, mais de três quartos a quase 100% são hipósomáticos ou anósomáticos quando testados clinicamente, dependendo do instrumento utilizado, dos critérios diagnósticos e de outros fatores (Barone et al., Romenets et al., 2012, Busse et al., 2012, Casjens et al., 2013). Dada a sua alta prevalência, a hiposmia possui valor diagnóstico considerável quando combinada com outras

As complicações gastrointestinais são uma queixa comum entre os pacientes com Parkinson (Pfeiffer, 2012). As taxas de prevalência de sintomas variados como baba, náusea, constipação, disfagia, gastroparesia e disfunção defectiva variam de 30% a 80% (Martinez-Martin et al., 2011; Khedr et al., 2013)

Distúrbios do sono e ritmos circadianos estão entre os sintomas não-motores mais comuns da doença de Parkinson, afetando significativamente a qualidade de vida dos pacientes (Martinez-Martin et al., 2011). Em um estudo recente de sintomas em 388 pacientes, 87,4% relataram ter problemas de sono (Kurtis et al., 2013). Pacientes tipicamente se queixam de sono frequente e diurno, mas também experimentam hipertensão noturna e interrupção do sono, fase de movimento rápido dos olhos (Christensen et al, 2012, Peeraully et al., 2012, Videnovic e Golombek, 2013).

1.1.1 Epidemiologia da Doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa mais frequente em humanos, com frequência fortemente relacionada com a idade, estimando-se sua incidência em 10-50/100.000 pessoas-ano e a prevalência na faixa de 100-300 por população de 100.000 pessoas (Elbaz et al., 2016). Mesmo que a maioria dos casos seja esporádica, aproximadamente 10% de todos os casos são devidos a mutações genéticas (Hindle, 2010).

Em 2008, a DP constituiu a causa da morte de 110.000 pessoas (OMS, 2008). De acordo com estimativas, o número total de pessoas com doença de Parkinson com idade

superior a 50 anos nos cinco países mais populosos da Europa ocidental e nos 10 países mais populosos do mundo aumentará de 4,1 a 4,6 milhões (dados de 2005) para 8,7 a 9,3 milhões, no ano de 2030 (Dorsey et al., 2007).

Nesse sentido, o Brasil será o 5º país com maior número de portadores da doença, com aproximadamente 340 mil pessoas acometidas (Souto, 2009). De acordo com dados da Associação Brasileira de Parkinson, em 2008 existiam 200.000 brasileiros afetados pela DP, com incidência de 1/500 idosos. Um estudo no Brasil, com base populacional, identificou a prevalência de 3,3% de DP em indivíduos acima de 60 anos de idade e não apresentou diferença estatisticamente significativa entre homens e mulheres (Barbosa et al., 2006). De acordo com o censo 2000 do IBGE, a incidência da DP nos brasileiros é de 700/100.000 indivíduos com idade entre 60-69 anos, e de 1.500/100.000 indivíduos com idade entre 70-79 anos. No entanto, 10% dos pacientes possuem menos de 50 anos de idade. E aproximadamente 36 mil novos casos são estimados por ano (Souza et. al., 2011).

Pringsheim e colaboradores (2014), ao analisarem a prevalência de DP em diferentes regiões geográficas, identificaram, para a faixa etária de 70 a 79 anos, uma prevalência significativamente menor na Ásia que na América do Norte, Europa e Austrália. Em outras faixas etárias, a prevalência na Ásia também tende a ser menor que em outras regiões. Suscetibilidade genética ou exposição a riscos ambientais podem razoavelmente explicar esses achados.

Pringsheim e colaboradores (2014) também identificaram um aumento constante na prevalência de DP com a idade em todas as regiões do mundo. Este achado confirma dados obtidos por outros autores (Rijk et al., 1995; Munoz et al., 1995), embora outros relatam um pico de prevalência aos 70 anos de idade, seguido de redução a partir de 80 anos. Por sua vez, Twelves e colaboradores (2003) relatam que a incidência DP continua a aumentar em pessoas com idade superior a 80 anos. Quanto a prevalência relacionada ao sexo, uma taxa menor foi observada em mulheres na faixa etária de 50 a 59 anos.

Do ponto de vista neurobiológico, algum apoio para este resultado pode ser visto no estudo de Haaxma e colaboradores (2007), onde relataram que as mulheres, ao adquirirem DP, podem exibir um fenótipo mais benigno, com progressão mais lenta da doença do que os homens. Os autores especulam que esta diferença fenotípica é atribuível a uma maior atividade de estrogênio, o que leva por sua vez a um maior nível de dopamina no estriado.

1.1.2 Etiopatogenia da Doença de Parkinson

A DP é uma doença neurodegenerativa progressiva e irreversível que tem como principal característica histopatológica a morte de neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc, *substantia nigra pars compacta*) no mesencéfalo (Hornykiewicz, 2006). A presença de agregados proteicos insolúveis, denominados corpos de Lewy, no citoplasma neuronal também é uma peculiaridade da DP (Le et al., 2009).

A SNpc é uma região do encéfalo rica em dopamina que contém neuromelanina e um elevado teor de ferro, relacionados com a neurodegeneração específica que ocorre na DP. A diminuição dos neurônios dopaminérgicos e a consequente redução da neuromelanina são responsáveis pela cor pálida na substância negra de pacientes com DP, em comparação com indivíduos controles saudáveis pareados por idade, caracterizando um marco neuropatológico da doença (Forno et al., 1996).

A perda desses neurônios na SNpc afeta principalmente a via nigroestriatal, com consequente depleção intensa de dopamina no núcleo estriado. As alterações dos níveis de acetilcolina, glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) no núcleo subtalâmico, tálamo e no córtex também se relacionam com a sintomatologia clínica da desordem (Wichmann & De Long, 2003). A perda de neurônios não-dopaminérgicos, como os neurônios noradrenérgicos do *locus coeruleus*, neurônios colinérgicos no núcleo basal de Meynert e neurônios serotoninérgicos nos núcleos da rafe também está envolvida com a fisiopatologia da DP (Jellinger, 1999).

A Fig. 1 apresenta esquema da via nigroestriatal e as alterações observadas na doença de Parkinson.

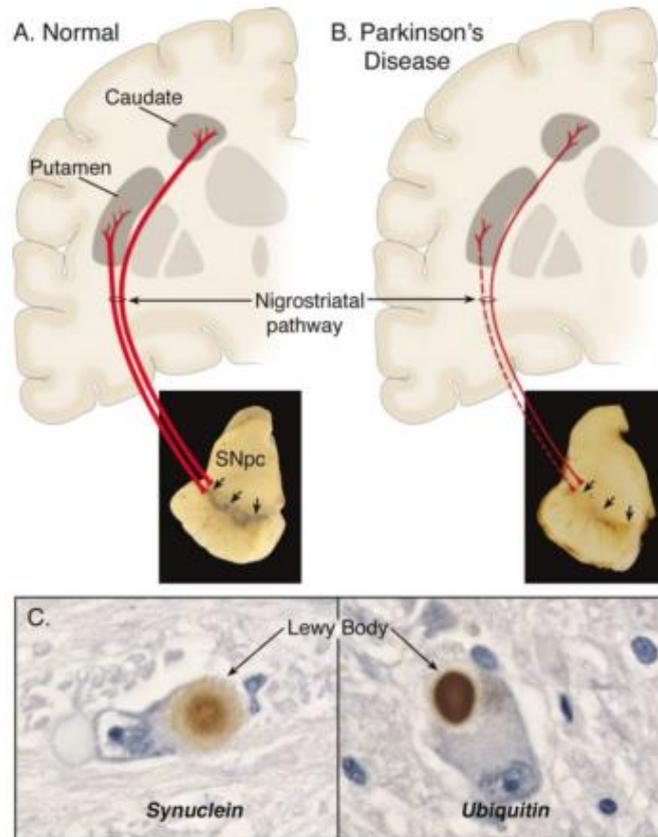


Figura 1: Neuropatologia da DP. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. Neurônios dopaminérgicos localizados na SNpc (setas pretas) projetam seus axônios (linhas vermelhas grossas) para os núcleos da base, fazendo sinapses no corpo estriado (putâmen e núcleo caudado). Observa-se a pigmentação normal do SNpc, resultante da presença de neuromelanina. (B) Representação esquemática da via nigroestriatal degenerada na DP. Há uma acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que se projetam para o putâmen (linha vermelha tracejada) e uma perda mais modesta daqueles que se projetam para o caudado (linha vermelha fina). A imagem evidencia, também, a despigmentação da SNpc devido à perda acentuada de neurônios dopaminérgicos. (C) Imunohistoquímica de inclusões intraneuronais, denominadas corpos de Lewy, em um neurônio dopaminérgico da SNpc para visualização de α -sinucleína (esquerda) e ubiquitina (direita). (Retirado de Dauer & Przedborski, 2003).

A etiologia da DP ainda não está totalmente esclarecida e pode envolver uma cascata multifatorial de elementos deletérios (Le et al., 2009; Przedborski, 2005) em que interagem fatores genéticos (Hardy, 2010; Eriksen et al., 2005), senescência (Levy, 2007; Samii et al., 2004), exposição a toxinas ambientais em épocas pré, peri e pós-natais (Mangano & Hayley, 2009; Perry et al., 2007), estresse oxidativo (Anrather et al., 2006; Gao et al., 2003; Wu et al., 2003), disfunções mitocondriais (Yang & Lu, 2009) e neuroinflamação (Hirsch et al., 2005; Barcia et al. 2011).

Em relação aos fatores genéticos, um total de 18 loci em vários genes são propostos como relacionados ao desenvolvimento da DP. Mutações dentro destes 6 loci (SNCA, LRRK2, PRKN, DJ1, PINK1 e ATP 13A2) são causas bem validadas de parkinsonismo

familiar. A herança é autossômica dominante para SNCA e LRRK2 (embora mutações LRRK2 apresentam penetração variável). A herança é autossômica recessiva para PRKN, DJ1, PINK1 e ATP13A2. Além disso, polimorfismos dentro SNCA e LRRK2, bem como variações na MAPT e o GBA, são fatores de risco para a doença de Parkinson (Bekris et al., 2010).

Os fatores ambientais mais envolvidos na DP idiopática são os pesticidas, que podem induzir estresse oxidativo com aumento da peroxidação lipídica, danos no DNA, disfunção mitocondrial e, finalmente, disfunção de neurônios dopaminérgicos na SNpc (Dick, 2006; Jenner, 2003).

Há relato de um grupo de indivíduos diagnosticados com parkinsonismo após utilização de heroína contaminada 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina (MPTP). Esses pacientes desenvolveram bradicinesia, rigidez e tremor. Os sintomas progrediram ao longo de várias semanas e melhoraram com terapia de reposição de dopamina.

O MPTP atravessa a barreira hematoencefálica e, ao ser oxidado pela monoaminoxidase B (MAO-B), é transformado em 1-metil-4-phenylpyridinium (MPP⁺). O MPP⁺ se acumula nas mitocôndrias e interfere com a função do complexo I da cadeia respiratória. A semelhança química entre MPTP e alguns herbicidas e pesticidas sugere que toxinas ambientais similares ao MPTP possam desencadear a DP, mas nenhum agente específico foi identificado. Como é sabido, a atividade do complexo I mitocondrial está reduzida na doença de Parkinson, o que indica uma via comum com o parkinsonismo induzido por MPTP (Ballard et al., 1985).

A agregação de proteínas e a presença de corpos de Lewy (CL) são características histopatológicas proeminentes da DP. CL são agregados intracitoplasmáticos eosinofílicos formados por várias proteínas, tais como α -sinucleína, ubiquitina, sinfilina-1, proteína 14-3-3, tubulina e outras proteínas que compõem o citoesqueleto (Forno, 1996). CL também são características típicas de outras alfa-sinucleinopatias, no entanto, sua distribuição no sistema nervoso central é variável entre outras desordens e a DP. Estes agregados podem ser classificados em CL clássicos, localizados principalmente no tronco encefálico, e têm uma aparência hialina densa e rodeada por um halo, ou CL corticais, quando as estruturas são pouco definidas. A principal proteína componente de ambos os tipos de CL é α -sinucleína (Spillantini et al., 1997). Disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e/ou comprometimento do sistema proteossoma, são fatores potenciais para desencadear agregação de α -sinucleína em modelos de DP esporádicos (revisto por Arduino et al., 2010).

Apesar da presença de α -sinucleína nos CL ser um marcador histopatológico para a DP, os mecanismos que conduzem à transição gradual da alfa-sinucleína solúvel para CL insolúvel ou neurito de Lewy ainda são desconhecidos. Na forma familiar da DP, devido à mutação do gene Parkin, não é observada a patologia com CL clássico. Além disso, o parkinsonismo induzido por toxina não está associado com a formação de CL típico, sugerindo, assim, que os agregados de α -sinucleína não são uma causa da doença, mas provavelmente um mecanismo crônico de proteção celular contra a toxicidade da α -sinucleína oligomérica solúvel (revisto por Branco et al., 2010)

Outro fator relevante é o estresse oxidativo. Este é um estimulador chave da ativação da micróglia, que subsequentemente conduz à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) a partir dessas células, e, conseqüentemente, a morte neuronal dopaminérgica adicional para, finalmente, propagar e impelir a alimentação de um ciclo de morte de células neuronais e inflamação subjacente à progressão da doença (Block e Hong, 2005). A fonte do aumento do estresse oxidativo observado na doença de Parkinson não é clara, mas pode derivar da disfunção mitocondrial, aumento do metabolismo da dopamina (que pode produzir excesso de peróxido de hidrogênio e outras espécies reativas de oxigênio), o aumento de ferro reativo, deficiência nas vias de defesas antioxidantes, e / ou devido ao ambiente intracelular altamente oxidativo nos neurônios dopaminérgicos (Cardoso et al., 2009).

Na DP o estresse oxidativo também pode estar relacionada a uma ativação de receptores de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA), com um aumento da produção de espécies reativas de nitrogênio (ERNs) devido a superativação de óxido nítrico sintase (ONS) (Garthwaite et al., 1988; Bredt et al., 1991). Um defeito mitocondrial gera EROs, especialmente o ânion superóxido (O_2^-), que reage rapidamente com o radical livre ON criando o radical peroxinitrito ($ONOO^-$) (Beckman et al., 1990; Lipton et al., 1993). Excessiva formação de EROs/especies reativas de nitrogênio (ERNs) por esses dois processos podem induzir deficiência do sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) e / ou mal enovelamento de proteínas de chaperonas moleculares, resultando, assim, na agregação de proteínas e danos neuronais (Nakamura e Lipton, 2009). Este é um outro ponto de intersecção entre mitocôndrias e o funcionamento do SUP, uma vez que mitocôndrias produzem excesso de EROs, podem afetar adversamente atividade do SUP (Fig. 2).

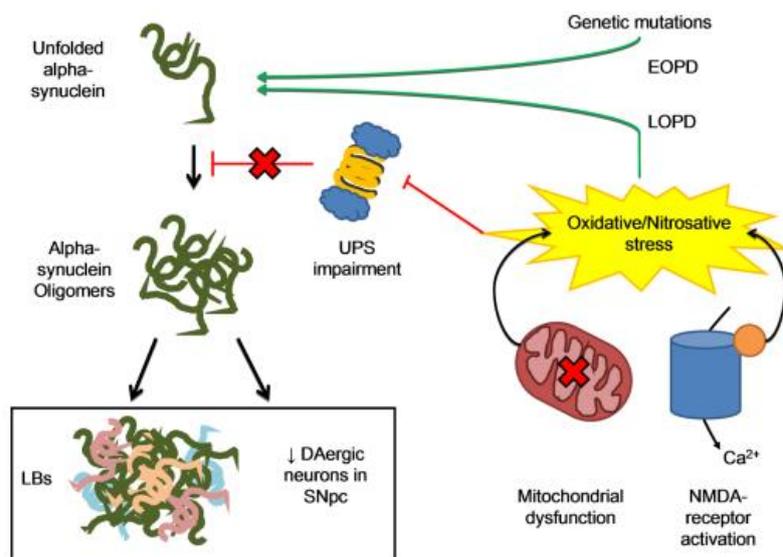


Figura 2: Processo de enovelamento incorreto da alfa-sinucleína. Mutações genéticas, formas familiares da DP ou mudanças pós translacionais da proteína, principalmente devido ao estresse oxidativo/nitrosativo interferem com esse processo. Dois eventos principais estão relacionados à formação de espécies reativas de oxigênio: o influxo de cálcio, devido a ativação de receptores de glutamato do tipo NMDA ou ativação da NOS neuronal; a respiração mitocondrial disfuncional. (Retirado de Branco et al, 2010)

1.1.3 Neuroinflamação e Doença de Parkinson

É sabido que a neuroinflamação crônica é um mecanismo primário envolvido na patogênese de uma variedade de desordens neurodegenerativas, tais como as doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington e a esclerose lateral amiotrófica (Wyss-Coray and Mucke, 2002; Liu and Hong, 2003; Glass et al., 2010; Herrup, 2010).

Vários estudos clínicos e experimentais apoiam o papel da micróglia e o aumento dos níveis de mediadores como citocinas, quimiocinas e espécies reativas de oxigênio na patologia da DP (Barcia et al., 2011; Cao et al., 2011; Crotty et al., 2008; Depino et al., 2003; Hirsch & Hunot, 2009; Long-Smith et al., 2010)

A micróglia torna-se ativada, diretamente, por uma toxina, patógeno ou proteína endógena, ou indiretamente, por neurônios em degeneração. Ressalta-se que, ao mesmo tempo em que uma ligeira ativação da micróglia tem efeitos benéficos aparentes, uma ativação crônica da micróglia em resposta a lesão neuronal, como é evidente na DP, pode

resultar na morte de células que, de outro modo, seriam viáveis (Gao e Hong, 2008; Perry et al, 2010).

A ativação da micróglia a partir de neurônios lesados pode ser de longa duração e auto propulsora, devido ao feedback positivo vindo da degeneração de neurônios, mesmo que a agressão inicial tenha cessado. Este ciclo repetitivo de ativação neurotóxica da micróglia em resposta a lesão neuronal é referido como microgliose reativa e é uma característica de várias patologias do cérebro (Block e Hong, 2005). Essa situação é extremamente importante na DP, uma vez que os neurônios dopaminérgicos na SNpc são particularmente susceptíveis a neurotoxicidade mediada pela micróglia, devido às altas densidades dessas células (Kim et al., 2000).

Mogi e colaboradores (1994), em estudo *post mortem*, mostraram níveis elevados de Interleucina 1- β (IL-1 β) e interleucina 6 (IL-6), Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF- α) e Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) no estriado de indivíduos com DP quando comparados a pacientes não parkinsonianos.

Sawada e colaboradores (2006) também mostraram maior expressão de IL-6 e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) em outras regiões além da área nigroestriatal, como hipocampo e córtex cerebral. Em conjunto, esses dados indicam que a neuroinflamação e o conjunto de fenômenos a ela associados podem contribuir para a cascata de eventos que conduzem à degeneração neuronal (Hirsch & Hunot, 2009; Tansey et al., 2007).

Citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein-1) têm sido implicados como fatores etiológicos em uma variedade de estados de doença neurológica, incluindo a doença de Alzheimer (Fillit et al., 1991; Merrill, 1992), esclerose múltipla e DP (Boka et al., 1994; Mogi et al, 1996). Micróglia e astrócitos são vistos como as principais fontes de citocinas e quimiocinas, que desempenham um papel nas respostas inflamatórias cerebrais (Ransohoff et al., 1996; Stoll et al., 1999). Ambos os tipos de células exibem um fenótipo reativo em associação com doenças neurodegenerativas (Dickson et al., 1993; Masliah & LiCastro, 2000; Vila et al., 2001), bem como em resposta a agressões neurotóxicas (Sriram et al., 2002; Sriram et al., 2004). Estas observações sugerem que a conversão de células gliais para o seu estado "reativo", e o aumento associado na expressão de citocinas e quimiocinas, pode desempenhar um papel na neurodegeneração.

TNF- α é proeminente entre citocinas pró-inflamatórias associadas a efeitos neuropatológicos relacionados a várias desordens neurodegenerativas (Fillit et al., 1991;

Mogi et al., 1994), e medeia os seus efeitos biológicos através de seus receptores, TNF- α 1 (p55) e TNF- α 2 (p75). Dentro do sistema nervoso central, o TNF- α é predominantemente expresso por células gliais, especialmente micróglia (Gregersen et al., 2000), vale ressaltar que já foi reportada a expressão do mesmo em micróglia ativada na substância negra de pacientes com DP (Hunot et al., 2003; Sawada et al., 2006).

1.1.4 Fatores neurotróficos

Os fatores neurotróficos são proteínas que desempenham papéis importantes durante o desenvolvimento do sistema nervoso, relacionados a manutenção de populações neuronais e a sua sobrevivência e maturação até a idade adulta. Dentre eles estão, o BDNF (Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro), Neurotrofinas 3 e 4 (NT- 3, NT-4) e NGF (Fator de Crescimento do Nervo). Neste contexto, a atuação dos fatores neurotróficos vem sendo cada vez mais investigado no cérebro parkinsoniano, com a ajuda de modelos animais e estudos clínicos (Aron & Klein, 2011; Hegarty et al., 2014; Weissmiller & Wu, 2012).

Já foi demonstrado que o BDNF promove a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos da SN, e foi capaz de proteger culturas puras desses mesmos neurônios contra a toxicidade do MPP + (Hyman et al., 1991). Além disso, o BDNF também foi encontrado em astrócitos nestina-positivos nos núcleos da base de camundongos lesionados com MPTP, desta forma, os fatores neurotróficos podem não só mediar os seus efeitos diretamente sobre os neurônios, mas também através das células gliais (Chen et al., 2004).

Outros estudos relatam que camundongos heterozigóticos para BDNF submetidos a 90 dias de exercício sem restrições, não tiveram os neurônios dopaminérgicos protegidos contra a neurotoxicidade induzida pelo MPTP, o que sugere que o complemento total de BDNF é essencial para a proteção dos neurônios dopaminérgicos induzida por exercício (Gerecke et al., 2012). Além disso, a sinalização através de TrkB (receptor de tirosina-quinase B), um dos receptores para as neurotrofinas, incluindo BDNF, é importante para a sobrevivência dos neurônios dopaminérgicos. Camundongos hipomórficos para TrkB mais velhos, que estejam expressando o receptor entre um quarto à um terço da quantidade normal, mostram uma perda significativa de neurônios dopaminérgicos na SN, acompanhado por um aumento da gliose reativa. Esses camundongos hipomórficos para TrkB exibem, também, uma redução significativamente maior no número de neurônios dopaminérgicos após a administração de MPTP, indicando que uma redução na sinalização TrkB aumenta a

vulnerabilidade de neurônios a morte celular induzida por esta pró neurotoxina (Baydyuk, 2011).

Outra neurofina importante é o NGF. A aplicação exógena de NGF apresentou perfil benéfico para o sistema nigroestriatal, aumentando o teor de dopamina nos núcleos da base de camundongos lesionados com MPTP (Garcia et al., 1992). Além disso, o NGF e a neurotrofina-3 foram encontrados co-localizados em astrócitos reativos nos núcleos da base de camundongos tratados com MPTP (Chen et al., 2006), o que sugere o papel neuroprotetor de astrócitos reativos na DP.

1.2 Modelos experimentais de Doença de Parkinson

Alguns modelos experimentais têm sido utilizados em estudos que visam esclarecer os mecanismos subjacentes à patogênese da DP (Smeyne & Jackson-Lewis, 2005).

Os modelos de indução por fármacos são utilizados principalmente para investigação de tratamentos farmacológicos, o principal fármaco utilizado é a reserpina. Apresenta semelhança neuroquímica com a doença de Parkinson e a geração de acinesia e rigidez. Porém, inibe o transportador vesicular de monoamina, levando a depleção de outras aminas além da dopamina. Além disso, não gera morte dopaminérgica nigral e deve ser administrada por via intracerebral (Duty & Jenner, 2011).

O modelo de administração intranigral de LPS (lipopolisacarídeo) reproduz os eventos inflamatórios relacionados à doença de Parkinson e leva à morte neuronal dopaminérgica por estresse nitrativo e citocinas pró-inflamatórias. A administração de LPS se dá por via intracerebral e desenvolvimento sintomático unilateral, caracterizando uma limitação desse modelo (Duty & Jenner, 2011).

Modelos genéticos podem ser aplicados em camundongos, *Drosophila megalomaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Dario dario*, mas ainda não reproduzem a sintomatologia do parkinsonismo e de fato contribuem mais para as discussões sobre a patogênese da doença de Parkinson (Duty & Jenner, 2011).

Quanto ao modelo da 6-Hidroxi-dopamina (6-OHDA), ele permite traçar estratégias terapêuticas e neuroprotetoras, e também observar consequências da morte neuronal dopaminérgica em curto período de tempo. Apresenta perfil neuroquímico, neuroinflamatório e morte neuronal nigroestriatal por estresse oxidativo e disfunção mitocondrial semelhante à

doença de Parkinson. Entretanto, a lesão é restrita à área de injeção da droga, não há formação de corpos de Lewy e a administração intracerebral é unilateral – a administração bilateral gera disfagia e dificulta o manejo do animal. Portanto, acometimento motor é unilateral, não se assemelhando a sintomatologia da doença de Parkinson. (Bové & Perier, 2012).

Em relação aos modelos induzidos por pesticidas, as drogas em destaque são rotenona e paraquat. A rotenona é altamente lipofílica, favorecendo administrações sistêmicas, gera morte neuronal dopaminérgica por estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e inibição proteossômica além de provocar intenso perfil inflamatório. Também favorece a formação de corpos de Lewy, diminui atividade locomotora e responde favoravelmente a diferentes fármacos utilizados no tratamento de parkinsonismo, sendo melhor enquadrada na definição de modelo para neuroproteção. Apresenta alta toxicidade sistêmica solicitando administrações repetidas em baixas doses, além disso grande percentual de animais podem ser resistentes à ação da rotenona. Já o paraquat gera perfil inflamatório leve, morte de neurônios dopaminérgicos por estresse oxidativo e alterações comportamentais sem grande alteração do conteúdo estriatal de dopamina. Além disso, está associado à elevada taxa de mortalidade em roedores por disfunção respiratória e perda de peso (Bové & Perier, 2012).

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

Em nosso trabalho, utilizamos o modelo experimental de doença de Parkinson por administração intranasal (i.n.) de MPTP. A pró neurotoxina MPTP tornou-se uma abordagem amplamente utilizado para o estudo da DP. O desenvolvimento desse modelo é baseado na descoberta acidental feita no início de 1980, no norte da Califórnia, quando uma síndrome parkinsoniana, em jovens toxicodependentes, foi relacionada ao uso de heroína sintética contaminada com MPTP (Langston et al., 1983).

O MPTP, análogo de meperidina, é um subproduto da síntese química da heroína (Langston et al., 1999), responsável por proporcionar útil modelo de indução de DP em animais, com grande similaridade à observada no homem (Przedborski et al., 2000). Embora roedores sejam menos sensíveis à toxicidade do MPTP, são amplamente utilizados na pesquisa experimental por ser mais econômico, facilitar o manejo, além de ético, em relação

à utilização de primatas (Schmidt and Ferger, 2001). É o modelo de indução de DP mais utilizado, comumente aplicado em camundongos (Langston, 1985; Heikkila et al., 1984).

Deve-se enfatizar que, a escolha pelo modelo de DP induzido por MPTP traz consigo alguns desafios. Nota-se que o modelo produziu um amplo espectro de relatos comportamentais, em grande parte devido à variedade de regimes de dosagem disponíveis, e também às diferentes condições experimentais aplicadas, como por exemplo, a linhagem do camundongo, a idade, o peso corporal, o tempo da avaliação comportamental pós-administração do MPTP, bem como o ambiente de laboratório (Sedelis et al., 2001; Meredith e Kang, 2006; Rousset et al., 2003; Przedborski et al., 2001; Crabbe et al., 1999).

A neuropatologia induzida pelo MPTP é notavelmente semelhante à DP, destacando-se a perda de neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, e a depleção da dopamina no estriado (Dauer e Przedborski, 2003).

Neste estudo, a via de escolha para a administração da neurotoxina foi a intranasal, rota que forneceu indícios valiosos da sensibilidade do sistema olfatório frente às toxinas ambientais. A infusão de 1mg/narina desencadeou danos olfatórios, de memória e poucos prejuízos motores, como observado nas fases iniciais da DP (Prediger et al., 2010).

O número de substâncias químicas ambientais potencialmente envolvidos na etiologia da DP é alarmante. Diariamente, somos expostos a milhares de xenobióticos no ar, água e alimentos (Uversky, 2004). Em alguns casos, tais agentes podem entrar no cérebro através do neuroepitélio olfatório, um conceito denominado Hipótese do Vetor Olfatório (Doty, 2008) (Fig. 3).

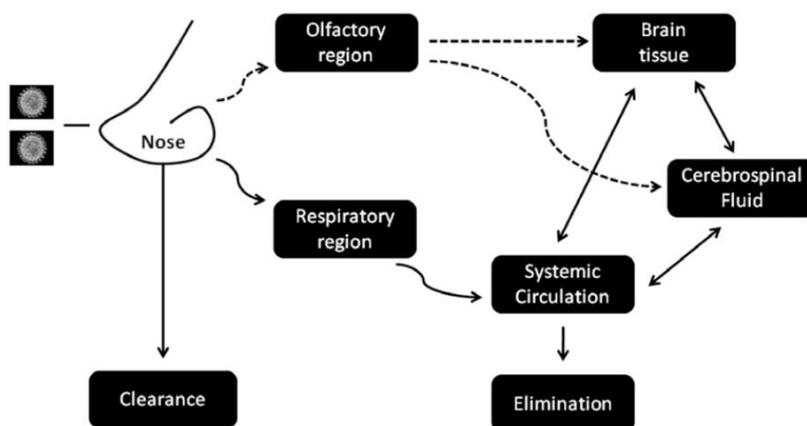


Figura 3: Ilustração esquemática das possíveis rotas de passagem de xenobióticos e drogas através de administração intranasal (Retirado de Prediger et al., 2011).

De acordo com esta hipótese, vários estudos demonstraram que i.n. de vírus (Barnett & Perlman, 1993), o cádmio (Hastings & Evans, 1991), a inalação de alumínio (Zatta et al., 1993) ou de manganês (Tjälve et al., 1996) pode resultar na invasão destes agentes no cérebro, em alguns casos prejudicar fortemente as estruturas cerebrais centrais. Corroborando com esta hipótese, observações apontaram que aproximadamente 90% dos pacientes nas fases iniciais da DP exibem distúrbios olfatórios não relacionados ao estágio da DP ou ao uso de medicações anti-DP (Doty et al., 1988; Doty, 2008).

Além disso, Braak e colaboradores (2004) apresentaram evidências, baseadas em estudos patológicos, que as alterações cerebrais iniciais, relacionadas com a DP, ocorrem dentro do bulbo olfatório e no núcleo dorsomedial do nervo vago. Posteriormente, Hawkes, Braak e colaboradores, propuseram uma hipótese de golpe duplo (Dual Hit Hypothesis) em que ambos os nervos olfatório e vago se encontram envolvidos simultaneamente, talvez a partir de um agente patogênico que entra através do nariz e engolido com as secreções nasais, passando da parede do estômago para os plexos de Auerbach e de Meissner. Esta é uma forma de explicar como alguns xenobióticos podem se introduzir tanto no nariz e no intestino para iniciar o processo da doença (Hawkes et al., 2007)

O MPTP no sistema vascular cerebral é captado pelas células da glia (Fig.4), principalmente pelo astrócito, e convertido a MPP⁺ (Hunot et al., 1999). Em seguida, O MPP⁺ é liberado no espaço extracelular e rapidamente capturado por células dopaminérgicas (Bezard et al., 1999; Gainetdinov et al., 1997), onde pode afetar mitocôndrias (Del Zompo et al., 1993), bloqueando os complexos I (Fonck & Baudry, 2003), III e IV (Suzuki et al., 1992).

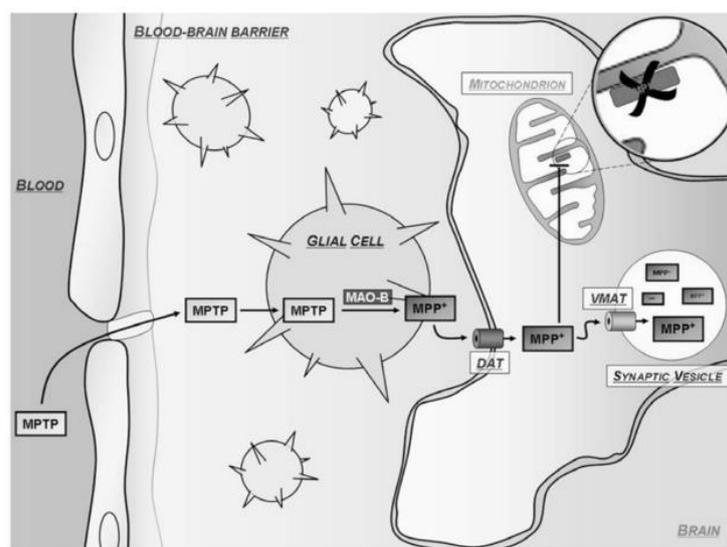


Figura 4: Ilustração esquemática de vias metabólicas do MPTP no sistema nervoso central (Retirado de Prediger et al., 2011)

2 JUSTIFICATIVA E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Recentemente, o Laboratório Profa. Conceição Machado mostrou que a infusão intranasal de MPTP, em ratos, resulta em redução dos níveis de GDNF (Glia cell line-Derived Neurotrophic Factor) no núcleo estriado aos 4 e 42 dias após a infusão. Por sua vez, os níveis estriatais de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) declinam ao longo desse período experimental. Em relação ao mesencéfalo ventral, o grupo de pesquisa não observou alteração dos níveis de BDNF (Ribeiro, 2013). Nesse mesmo trabalho, o grupo mostrou que há diminuição significativa dos níveis de TNF- α no mesencéfalo de ratos, aos 4 e 42 dias após a infusão de MPTP. Em relação a alterações ultraestruturais à microscopia eletrônica de transmissão, Ribeiro (2013) mostrou que, aos 42 dias, é possível observar sinais nítidos de degeneração neuronal no mesencéfalo ventral, tais como dilatação do envelope nuclear, vacuolização citoplasmática, desagregação de cristas mitocondriais e condensação de cromatina. Astrócitos, nesse mesmo período após infusão, também mostram alterações estruturais como agregação de filamentos intermediários e vacúolos citoplasmáticos.

Ribeiro (2013) também avaliou a atividade locomotora espontânea de ratos após infusão de MPTP e mostrou diminuição significativa do número de quadrantes cruzados e do número de *rearings* aos 31 dias após infusão, assim como da velocidade máxima em esteira aos 21 dias após infusão.

Em nosso trabalho, nos propusemos a avaliar o modelo de infusão intranasal de MPTP em camundongos, tendo em vista a possibilidade de utilização de animais *knock out* para receptor de TNF- α (TNFR p55), o que amplia sobremaneira as possibilidades de investigação dos fatores envolvidos com a degeneração neuronal. Ademais, o camundongo C57BL/6 é a linhagem mais sensível ao MPTP (Hamre et al., 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a utilização do modelo experimental de parkinsonismo por infusão intranasal de MPTP em camundongos para estudo de atividade motora, alterações ultraestruturais e da expressão de fatores neurotróficos e citocinas.

3.2 Objetivos Específicos

Em camundongos C57BL/6, submetidos ou não a administração de MPTP, pretende-se avaliar, aos 11 dias após a infusão:

- i) atividade locomotora no teste de campo aberto;
- ii) os níveis de GDNF e BDNF nos estriado e mesencéfalo ventral;
- iii) os níveis de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α e IFN- γ ;
- iv) as alterações ultra estruturais no mesencéfalo ventral e núcleo estriado

Pretende-se, também, de modo preliminar, avaliar as alterações ultraestruturais no mesencéfalo ventral e estriado em camundongos *knock out* TNFR p55.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 34 Camundongos machos C57BL/6 selvagens e 06 *knock out* TNFR p55, com idade entre 8-10 semanas e peso corporal na faixa de 22-27g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e pelo Laboratório coordenado pela Profa. Leda Quércia Vieira.

Existem muitos parâmetros que podem influenciar a reprodutibilidade e a sensibilidade das lesões nos camundongos, como por exemplo sexo, idade e peso corporal. Camundongos fêmeas exibem alta mortalidade em relação aos machos, portanto, são excluídas desse tipo de experimento (Przedborski & Jackson-Lewis, 2001).

Os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Departamento de Morfologia/ICB-UFMG, por todo o período experimental, em gaiolas plásticas (41 x 31 x 16 cm), três animais por gaiola, em temperatura de 21–23°C, com ciclos de iluminação de 12hs e com ração Nuvilab (Nuvital Nutrientes S/A, Brasil), água e alimentação *at libitum*.

Quando os animais atingiram a idade entre 8 e 10 semanas foram destinados aos seguintes procedimentos experimentais, sempre com pareamento de controles e submetidos à infusão intranasal com MPTP:

- i) atividade locomotora em teste campo aberto;
- ii) dosagem de fator neurotrófico;
- iii) dosagem de citocinas;
- iv) microscopia eletrônica de transmissão.

Os camundongos foram mortos 11 dias após a infusão intranasal com salina ou MPTP, previamente anestesiados com 300µL de solução contendo xilazina e cetamina. Esta solução anestésica foi preparada com 800 µL de solução salina 0,9%, 150 µL de cetamina e 50 µL de xilazina.

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

A administração de MPTP (1Metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, Sigma-Aldrich) foi realizada por via intranasal, em duas doses de 1mg/25 µL, uma dose por narina, sem anestesia. Estabeleceu-se o intervalo de 4 horas entre as duas doses com o objetivo de

diminuir a mortalidade dos animais, conforme informação pessoal do Prof. Rui Prediger (UFSC). Os animais controles receberam duas doses de solução salina estéreis, no mesmo intervalo de tempo utilizado para a administração de MPTP.

A definição desse intervalo entre as duas infusões e a utilização de manta térmica reduziu a taxa de mortalidade a quase zero. Przedborski & Jackson-Lewis (2001) já tinham relatado a ocorrência de taxas de mortalidade distintas de diferentes linhagens de camundongos devido a toxicidade periférica do MPTP e à hipotermia.

Para obtenção da solução estoque na concentração de 40 mg/mL, adicionou-se 2,5 mL de solução salina estéril ao frasco original de MPTP com 100 mg de MPTP, em capela de fluxo laminar. Alíquotas no volume de 50uL foram colocadas em tubos tipo eppendorf estéreis e armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A figura 5 ilustra o procedimento utilizado para a infusão intranasal de MPTP ou de salina, conforme preconizado por Prediger et al., 2010. O volume de 25 μL da solução estoque de MPTP foi infundido em cada narina através de uma cânula de polietileno PE-50 (Scientific Commodities Inc., EUA) conectada à microseringa Hamilton de 50 μl em bomba de infusão (Cole Parmer 74900, EUA), na taxa de 12,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ durante 2 minutos. Desse modo, cada animal recebeu a dose de 2 mg em volume final de 50 μl . Após infusão, os animais foram mantidos sobre manta aquecedora na temperatura de $46\text{ }^{\circ}\text{C}$.

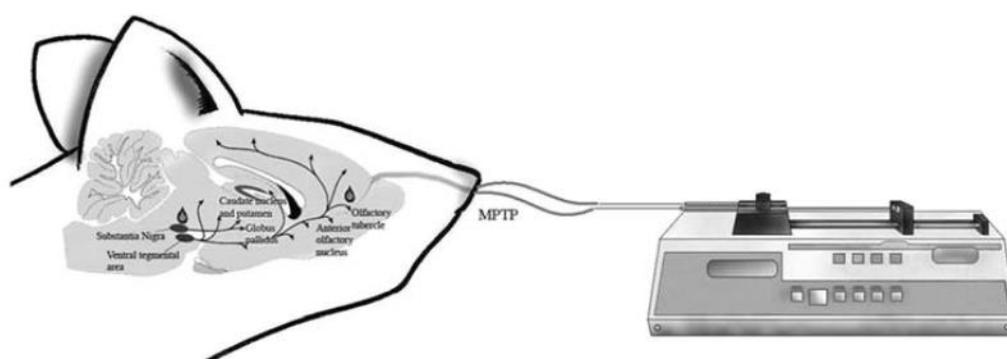


Figura 5: Esquema da administração intranasal de MPTP (1mg/narina) em camundongo.

(Retirado de Prediger et al., 2010)

Para a manipulação de MPTP, desde sua diluição até a finalização da infusão e descarte de material utilizado nos experimentos, os pesquisadores utilizaram máscara hemifacial modelo 6200 (3M, Brasil), macacão modelo MAC001 (Biosorbents Absorventes

Industriais, Brasil) e luvas. Ao final de cada experimento, o ambiente era higienizado com hipoclorito de sódio a 4% e o material descartado de modo apropriado, de acordo com as recomendações da Sigma-Aldrich para manipulação de MPTP e de Przedborski et al., 2001

A seguir descrevemos os procedimentos utilizados para análise da atividade locomotora em teste de campo aberto, das alterações estruturais no mesencéfalo ventral e núcleo estriado e para dosagem de citocinas e de fatores neurotróficos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, sob o número 069/2006.

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

O teste comportamental denominado Campo Aberto (Open Field Test) é utilizado em estudos experimentais para investigar simultaneamente a atividade locomotora e exploratória bem como níveis de ansiedade (Podhorna & Brown, 2002). É um método válido e amplamente empregado na avaliação de parâmetros comportamentais em modelos experimentais de diversas doenças humanas (Takahashi et al., 2006).

Nesse experimento foram utilizados 04 animais controles e 04 animais submetidos à infusão com MPTP.

O Campo Aberto consiste em uma arena opaca (106 cm X 106 cm) dividida em quadrantes iguais. Para iniciar o teste cada camundongo foi colocado no centro da arena para observação de sua locomoção livre durante quinze minutos. Parâmetros como atividade de locomoção, número de entradas no centro da arena e porcentagem de tempo gasto neste local (medida da ansiedade) foram registrados por um software de rastreamento (EthoVision XT, Noldus Information Technology, Leesburg, VA, USA).

A locomoção ou atividade locomotora dos animais foi definida pela distância total percorrida (cm) durante o tempo do teste (quinze minutos). A medida da ansiedade é a porcentagem de entradas e de tempo gasto no centro da arena (tempo ou entradas no centro da arena/tempo ou entradas no centro e na periferia da arena X 100), sendo que baixas porcentagens indicam maiores níveis de ansiedade.

4.4 Dosagem de fatores neurotróficos e de citocinas

Para dosagem de fatores neurotróficos e de citocinas no mesencéfalo ventral e no núcleo estriado foram utilizados 10 animais controles e 10 animais submetidos à infusão intranasal de MPTP. Sob anestesia com xilazina e cetamina, procedeu-se à remoção do mesencéfalo ventral e do núcleo estriado.

Para obtenção do homogenato, as amostras foram pesadas (100 mg) e colocadas em 1,0 mL de solução inibidora de proteases para extração de citocinas [NaCl 0,4 M; Tween 20 0,05%; Albumina de soro bovino (BSA) 0,5%; Fluoreto de fenilmetilsufonila (PMSF) 0,1mM; cloreto de benzetônio 0,1 mM; EDTA 10 mM; 20 UI de aprotinina], preparada a partir de uma solução de tampão fosfato (NaCl 8 g, KCl 0,2 g e Na₂HPO₄.12H₂O 2,89 g diluídos em 1 litro). Posteriormente, as amostras foram maceradas por um homogenizador de tecidos (Power Gen 125, Fisher Scientific Pennsylvania, EUA) a uma velocidade ótima e a solução resultante foi centrifugada a 10.000 r.p.m, a 4 °C, por 10 minutos (Centrífuga BR4, Jouan, Winchester, VA, EUA). O sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -80°C até a sua utilização para detecção da concentração dos mediadores inflamatórios e fatores neurotróficos por meio, respectivamente, das técnicas de CBA (Cytometric Bead Array) e ELISA (Ensaio imunoenzimático: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

A concentração das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17 TNF- α e IFN- γ no tecido cerebral foi analisada por meio do método CBA (Cytometric Bead Array). A concentração dos fatores neurotróficos BDNF, NGF e GDNF no tecido cerebral foi analisada pelo método ELISA. Os Kits de ELISA obtidos da R&D Systems (DuoSet) e os Kits de CBA TH1/TH2/TH7 obtidos da BD Biosciences, foram utilizados de acordo com os procedimentos previamente descritos pelo fabricante. A concentração dos mediadores inflamatórios foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Spectramax 190) no comprimento de onda de 450 nm no caso da técnica de ELISA e por leitura no instrumento FACSCanto (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) no caso da técnica de CBA.

4.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Aos 11 dias após infusão intranasal de salina ou de MPTP, os animais controles (N=3) e tratados (N=3) foram anestesiados com xilazina e cetamina e submetidos à perfusão intracardíaca com solução de salina, seguida de solução de Karnovsky modificada (paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2-7,4). A seguir, procedeu-se à remoção do encéfalo para retirada do mesencéfalo ventral e do núcleo estriado. Fragmentos pequenos dessas duas regiões foram mantidos em solução de Karnovsky modificada por 24 horas. A seguir as amostras foram levadas ao Centro de Microscopia da UFMG para processamento de rotina para análise em microscopia eletrônica de transmissão. Em síntese, as amostras foram fixadas em solução de tetróxido de ósmio a 2% em tampão fosfato, desidratadas em solução álcool etílico em concentração crescente, imersas em acetona e infiltradas em mistura de resina Epon/acetona. Após inclusão em resina Epon, as amostras foram seccionadas em ultramicrótomo Leica para obtenção de cortes semifinos. Após escolha da região adequada, foram obtidas secções ultrafinas para serem analisadas em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12, sob tensão de 80keV.

4.6 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo teste t- student, o pós-teste de Bonferroni foi utilizado quando necessário para múltiplas comparações. Utilizou-se o Software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Sinais pré-clínicos em modelo experimental de doença de Parkinson após infusão intranasal de MPTP

No presente estudo, os camundongos não apresentaram alterações significativas na distância total percorrida no campo aberto onze dias após a infusão intranasal de MPTP quando comparado aos controles, indicando que não houve comprometimento da atividade locomotora (Fig 6, $p=0.36$).

De forma interessante, os camundongos que receberam a infusão com o MPTP apresentaram comportamento do tipo ansioso, indicado pela redução significativa da porcentagem de tempo gasto ($p<0.001$) e de entradas ($p<0.02$) no centro da arena quando comparado aos controles (Fig 6, B e C).

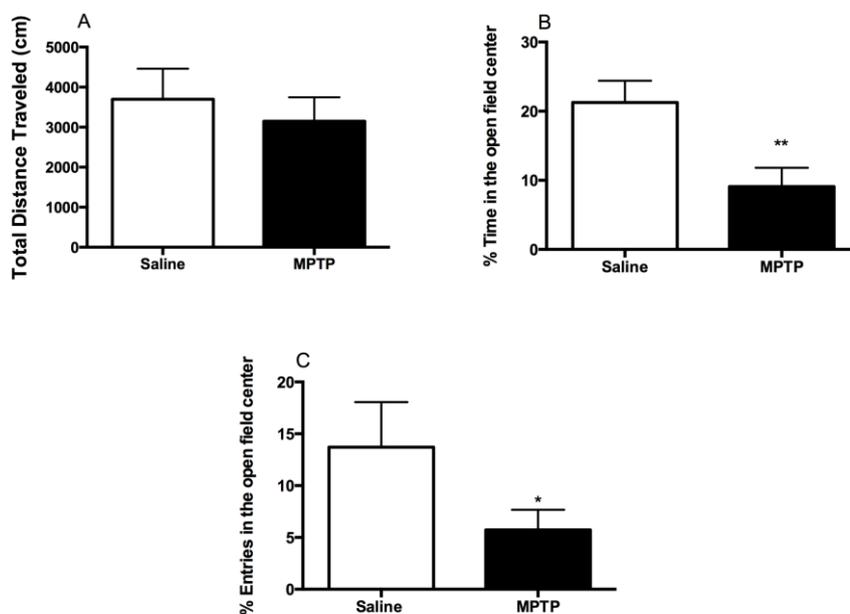


Figura 6: Teste de Campo Aberto com animais controles (N=04) e submetidos à infusão intranasal de MPTP (N=04). Aos 11 dias após infusão de MPTP, os animais apresentaram redução do número de entradas ($p<0.02$) e tempo gasto ($p<0.001$) no centro da arena em relação aos controles.

5.2 Níveis de fatores neurotróficos em mesencéfalo ventral e núcleo estriado

Os níveis de BDNF mostraram-se reduzidos no mesencéfalo ventral aos 11 dias após a infusão intranasal com MPTP (Fig.7 A). Os níveis de NGF, por sua vez, mostraram-se similares em ambos os grupos, controle e MPTP (Fig.7 B). Já os níveis de BDNF e de NGF no núcleo estriado mostraram-se elevados no grupo de animais submetidos à infusão com MPTP, em relação ao grupo controle (Fig. 8, A e B).

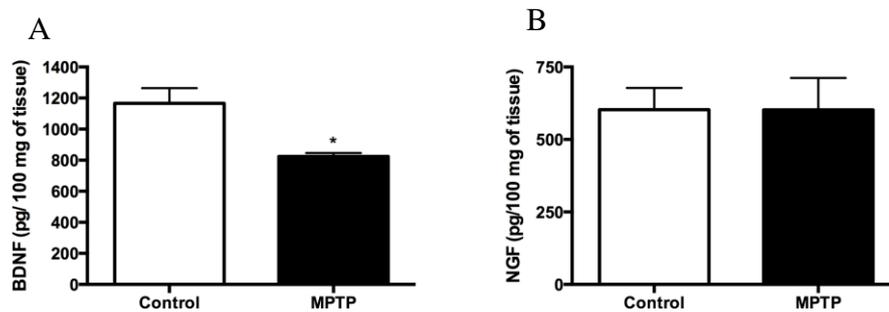


Figura 7: Níveis de BDNF e de NGF no mesencéfalo ventral de animais controles (N=04) e de animais submetidos à infusão intrasal com MPTP (N=04). Os níveis de BDNF mostraram-se reduzidos aos 11 dias pós-infusão de MPTP, em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$).

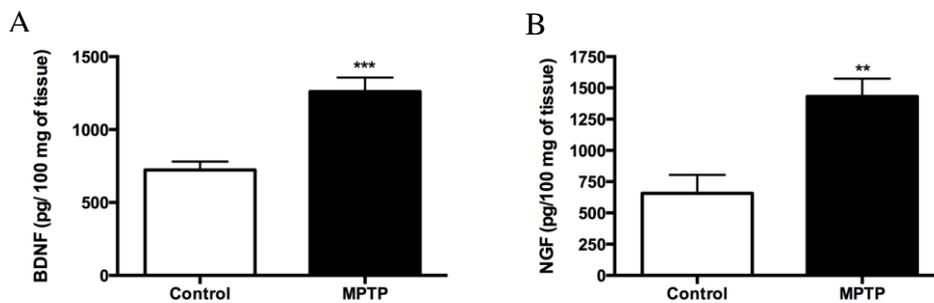


Figura 8: Níveis de BDNF e de NGF no núcleo estriado de animais controles (N=04) e de animais submetidos à infusão intrasal com MPTP (N=04). Os níveis de BDNF e de NGF mostraram-se elevados aos 11 dias pós-infusão de MPTP, em relação ao grupo controle (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

5.3 Níveis de citocinas em mesencéfalo ventral e núcleo estriado

Aos 11 dias após infusão de salina ou de MPTP, observou-se elevação significativa dos níveis de IL-10 e de IL-17A no mesencéfalo ventral do grupo submetido à infusão com MPTP em relação ao grupo controle, e nenhuma alteração nos níveis das citocinas os níveis de IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, TNF- α e IFN- γ (Fig. 9 A-G).

Em relação ao núcleo estriado, apenas os níveis de IL-17A mostraram-se mais elevados no grupo MPTP em relação ao grupo controle (Fig. 10).

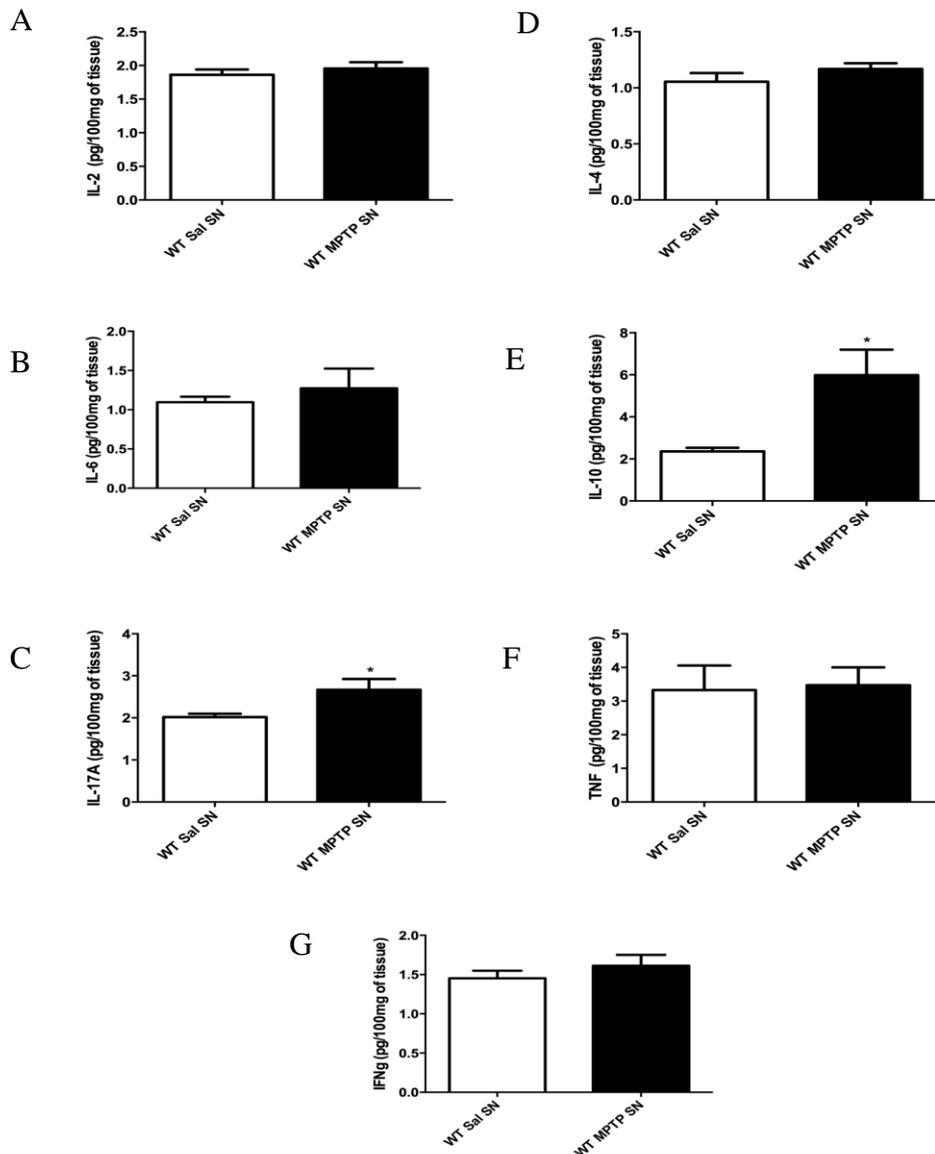


Figura 9: Níveis de citocinas no mesencéfalo ventral de animais controles (N=06) e submetidos à infusão com MPTP (N=06). Aos 11 dias após infusão com MPTP, os níveis de IL-10 e de IL-17A mostram-se mais elevados em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$).

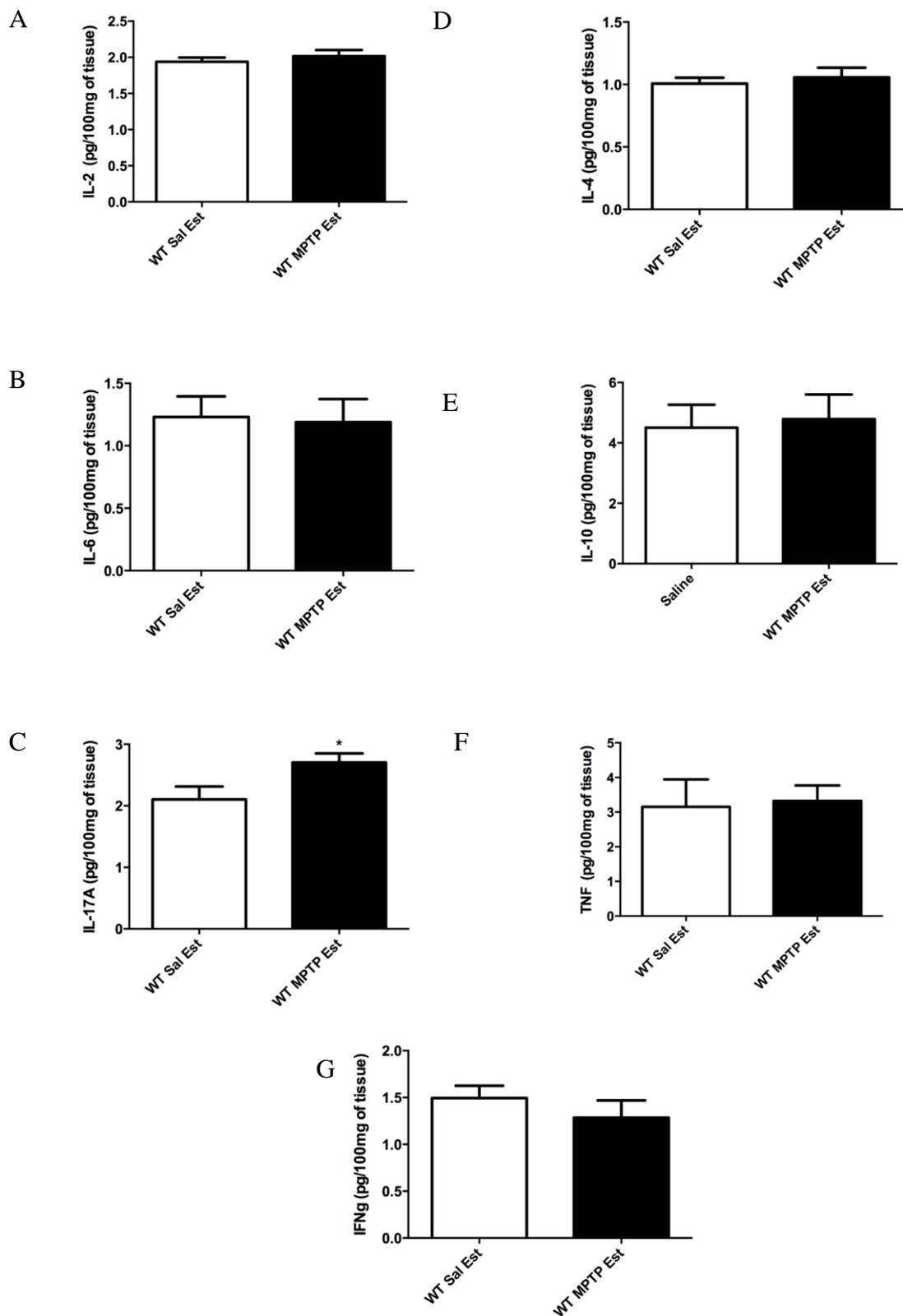


Figura 10: Níveis de citocinas no núcleo estriado de animais controles (N=06) e submetidos à infusão com MPTP (N=06). Aos 11 dias após infusão com MPTP, os níveis de IL-17A mostram-se mais elevados em relação ao grupo controle (* $p < 0,05$).

5.4 Alterações ultraestruturais no Núcleo Estriado e Mesencéfalo Ventral

A análise em microscopia eletrônica de transmissão mostrou que o grupo controle e o grupo MPTP apresentaram a organização característica de neurônios e glia no sistema nervoso central. As figuras 11, 12, 13 e 14 ilustram esses resultados.

De modo interessante, resultados preliminares obtidos com um grupo de camundongos *knock out* TNFR p55 aos 11 dias após infusão intranasal de MPTP revelou alterações degenerativas em neurônios e glia do mesencéfalo ventral e núcleo estriado. Essas alterações abrangiam vacuolização de citoplasma, dispersão da cromatina, rarefação e dilatação de botões sinápticos. As figuras 15, 16, 17, 18 e 19 ilustram esses achados.

Figura 11: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de salina. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, sem alterações estruturais. (A) Vista panorâmica da região do núcleo estriado. (B) Organização celular sem alterações estruturais das organelas. (C) Corpo celular de Neurônio em maior aumento, sem alterações estruturais. (D) Vista em menor aumento de neurônio. (E) e (F) região em maior aumento evidenciando organelas celulares sem alterações estruturais. Abreviações: N (núcleo), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), cabeça de seta (complexo de golgi), seta branca (sinapse), asterisco (mitocôndria), v (vesículas contendo neurotransmissores).

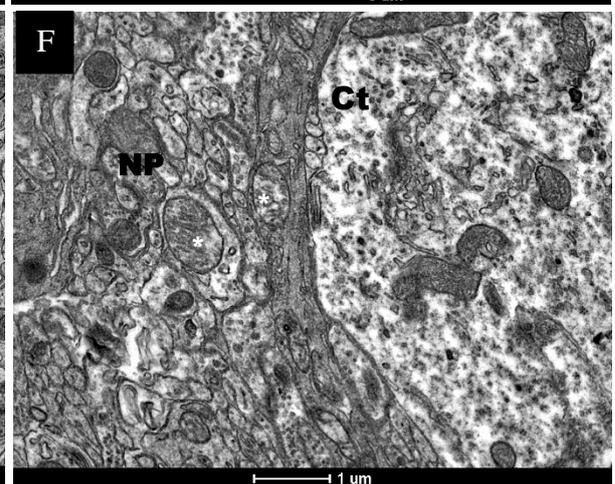
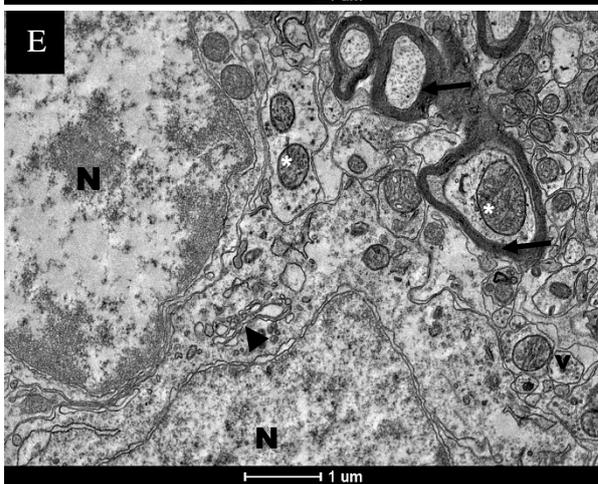
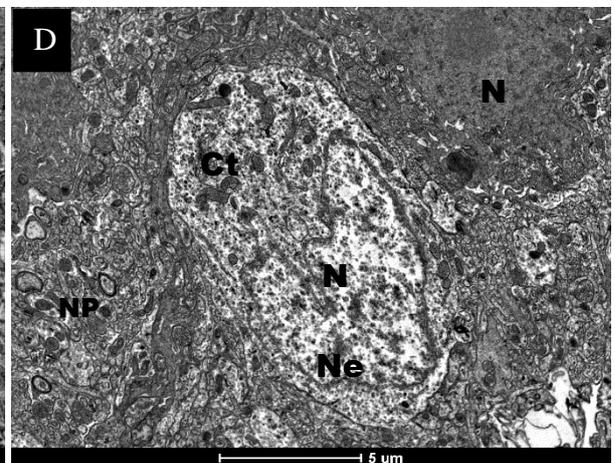
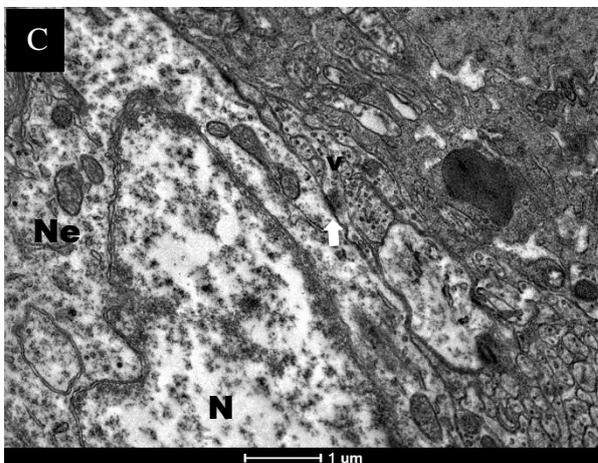
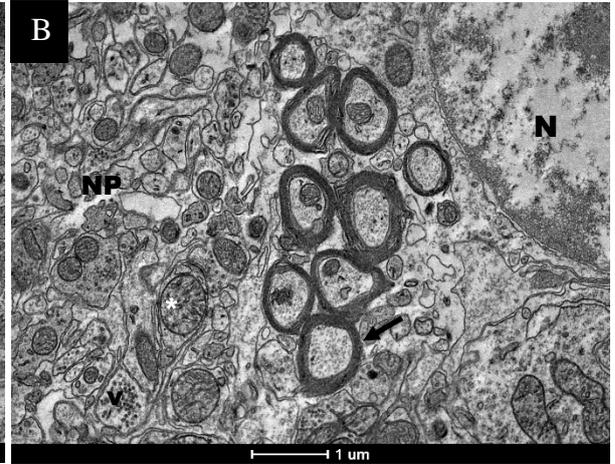
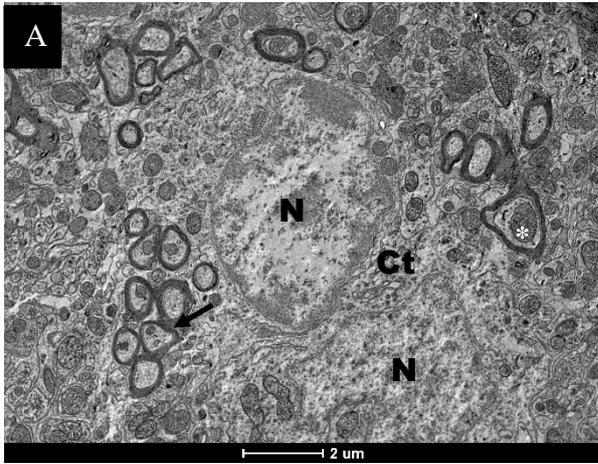


Figura 12: Ultraestrutura do mesencéfalo ventral de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de salina. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, sem alterações estruturais. (A) e (B) Vista panorâmica da região, organização celular sem alterações estruturais das organelas. (C) Corpo celular de Neurônio em maior aumento, sem alterações estruturais. (D) Região em maior aumento evidenciando organelas celulares sem alterações estruturais. Abreviações: N (núcleo), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), cabeça de seta (complexo de golgi), seta branca (sinapse), asterisco (mitocôndria), v (vesículas contendo neurotransmissores).

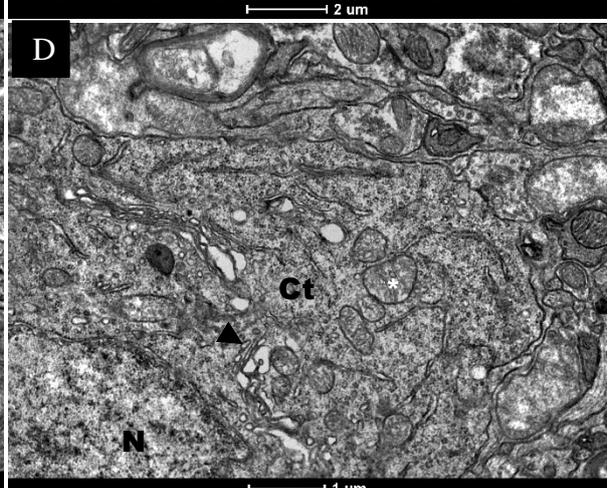
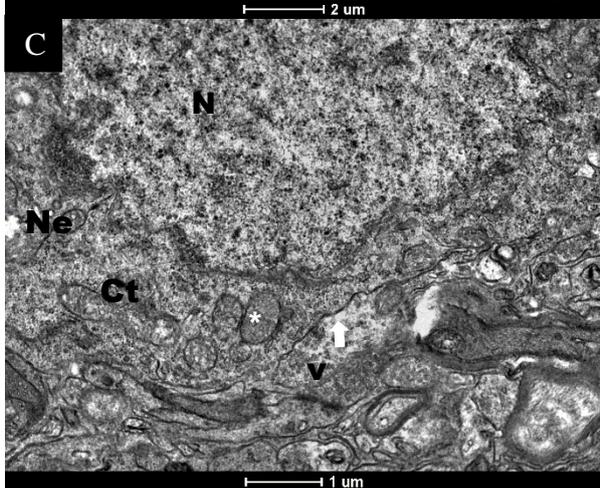
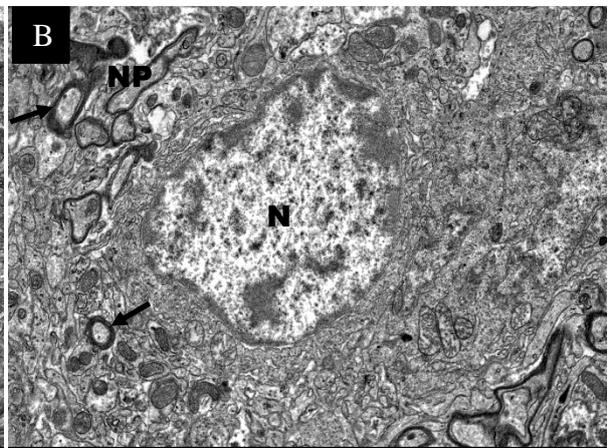
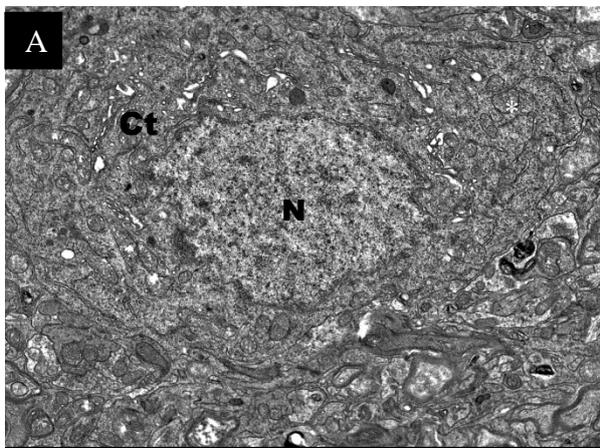


Figura 13: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de MPTP. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, sem alterações estruturais. (A) Corpo celular de neurônio em maior aumento, com estruturas sem sinais de degeneração. (B) Vista em maior aumento da região do núcleo estriado, organização celular sem alterações estruturais das organelas. (C) Corpo celular de Neurônio em menor aumento, sem alterações estruturais. (D) Região em menor aumento evidenciando organelas celulares sem alterações estruturais. Abreviações: N (núcleo), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), cabeça de seta (complexo de golgi), seta branca (sinapse), asterisco (mitocôndria), v (vesículas contendo neurotransmissores).

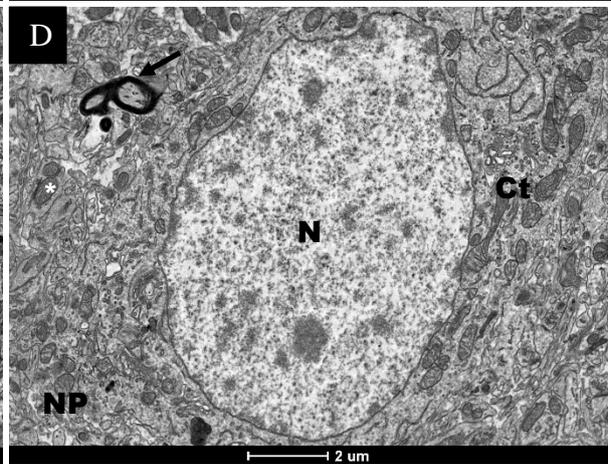
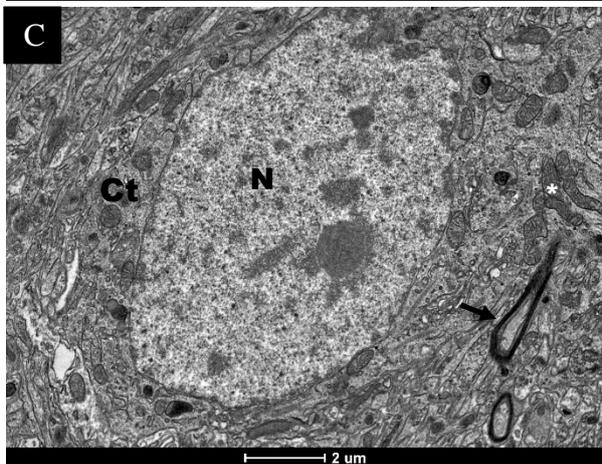
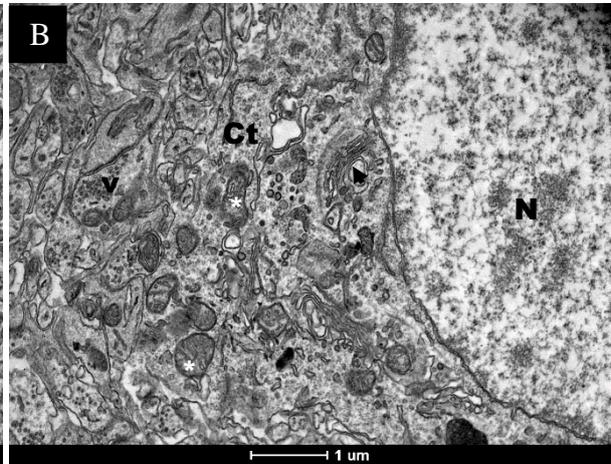
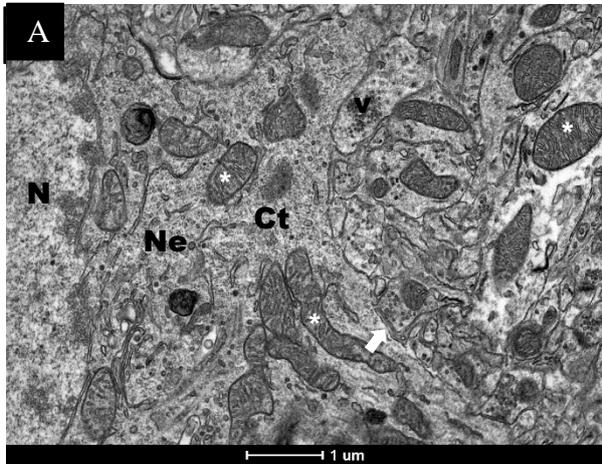


Figura 14: Ultraestrutura do mesencéfalo ventral de camundongos selvagens (C57BL/6) mortos 11 dias após infusão de MPTP. Imagens representativas de neurônio, neuropilo e glia, sem alterações estruturais. (A) e (B) Corpo celular de neurônio em maior aumento, com estruturas sem sinais de degeneração. Abreviações: N (núcleo), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), cabeça de seta (complexo de golgi), seta branca (sinapse), asterisco (mitocôndria), v (vesículas contendo neurotransmissores).

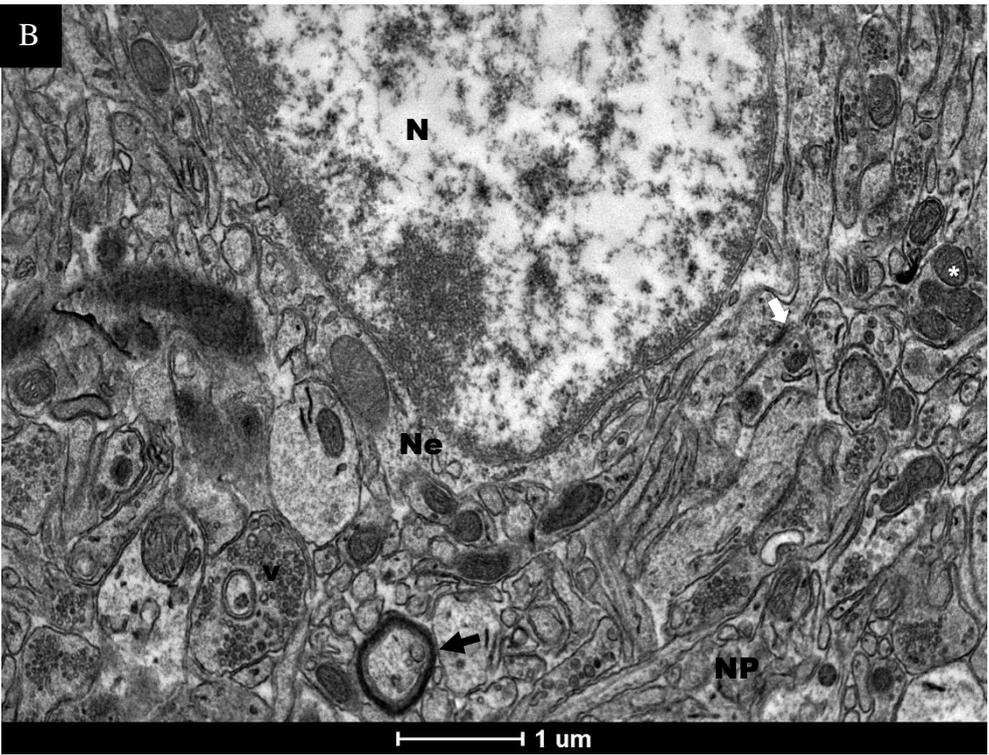
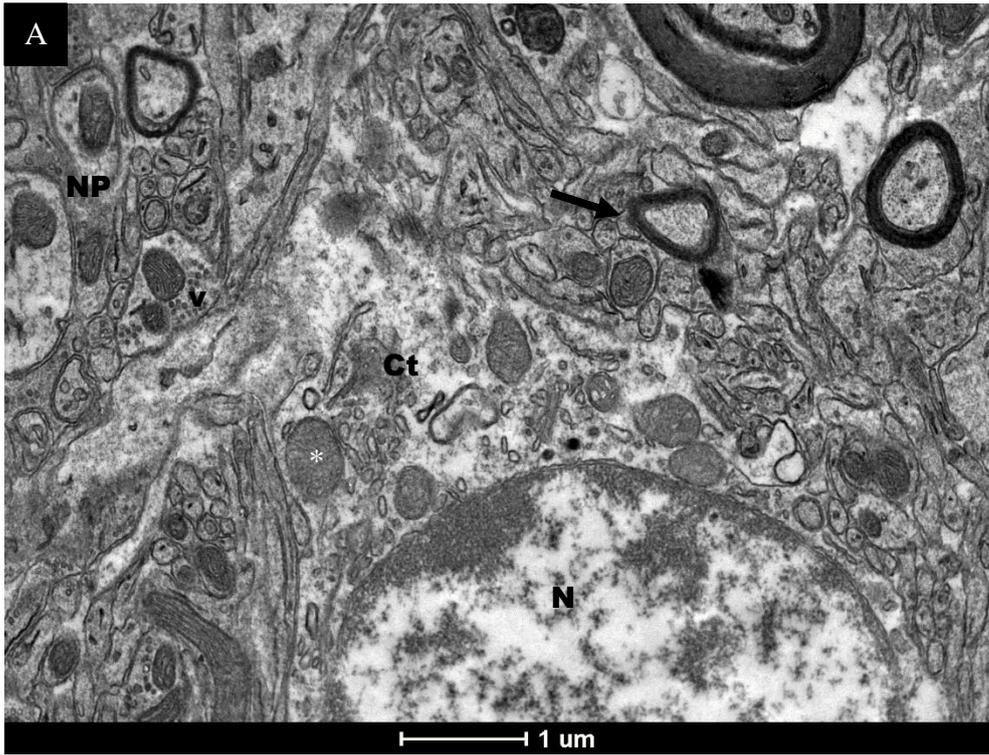


Figura 15: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos Knock out (KO P55) mortos 11 dias após infusão de salina. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, sem alterações estruturais. (A) Imagem panorâmica da região do núcleo estriado sem alterações estruturais. (B) e (C) Corpo celular de neurônio em maior aumento, com estruturas sem sinais de degeneração. Abreviações: N (núcleo), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), cabeça de seta (complexo de golgi), seta branca (sinapse), asterisco (mitocôndria), v (vesículas contendo neurotransmissores).

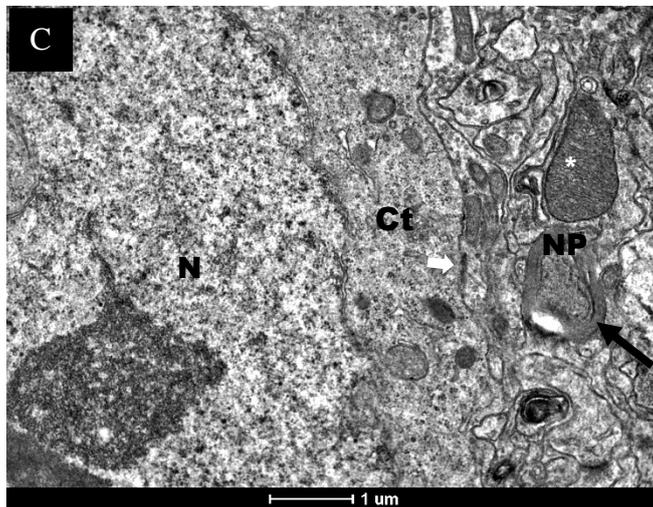
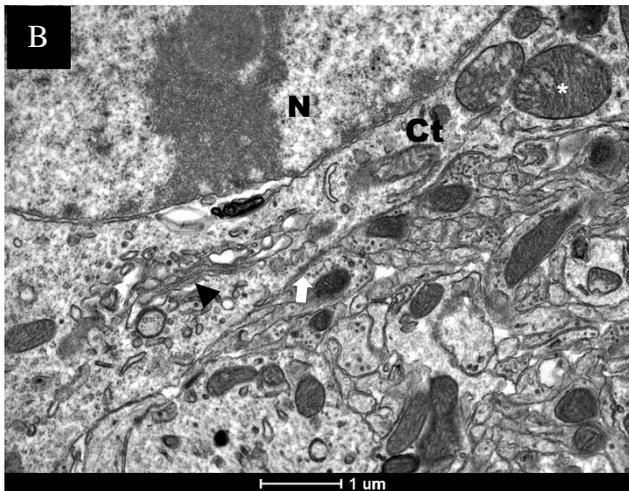
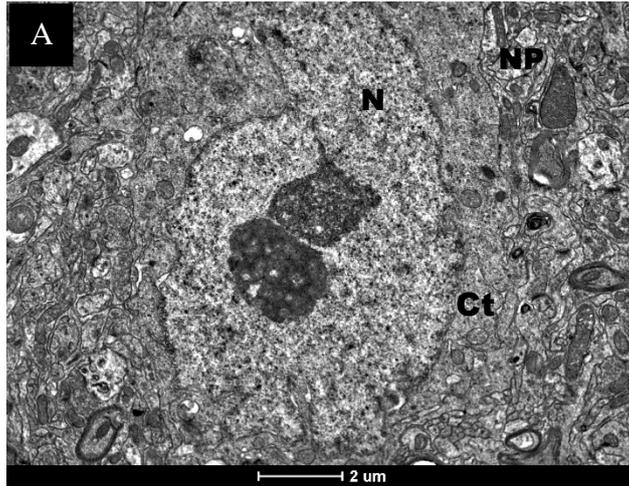


Figura 16: Ultraestrutura do Mesencéfalo Ventral de camundongos Knock out (KO P55) mortos 11 dias após infusão de salina. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, sem alterações estruturais. (A) Imagem panorâmica da região sem alterações estruturais. (B) e (C) Corpo celular em maior aumento, com estruturas sem sinais de degeneração. Abreviações: N (núcleo), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), cabeça de seta (complexo de golgi), seta branca (sinapse), asterisco (mitocôndria), v (vesículas contendo neurotransmissores).

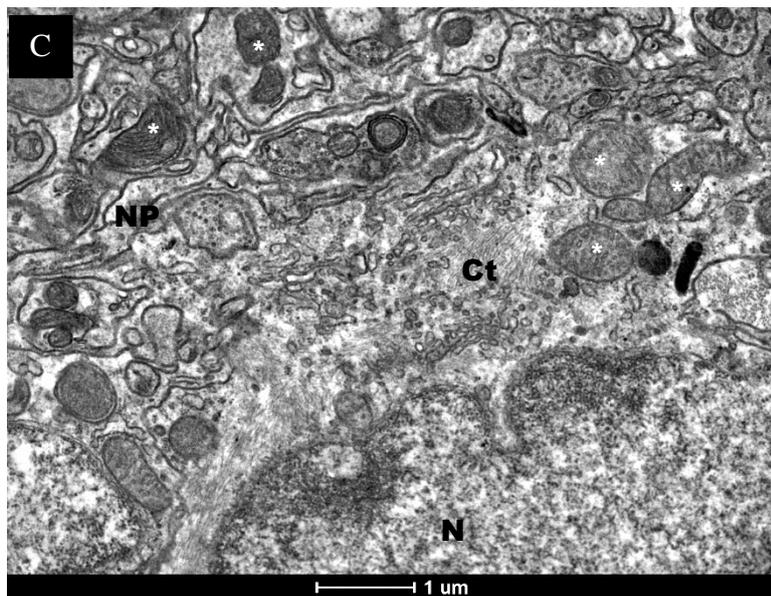
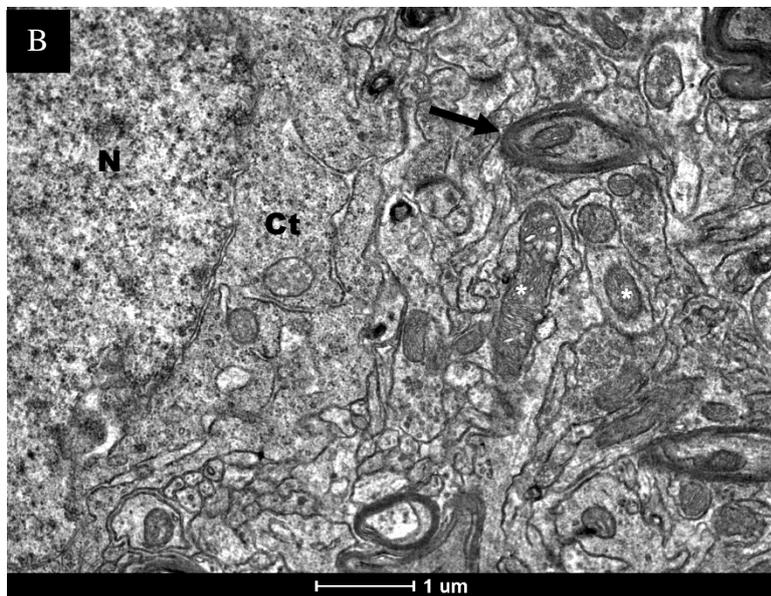
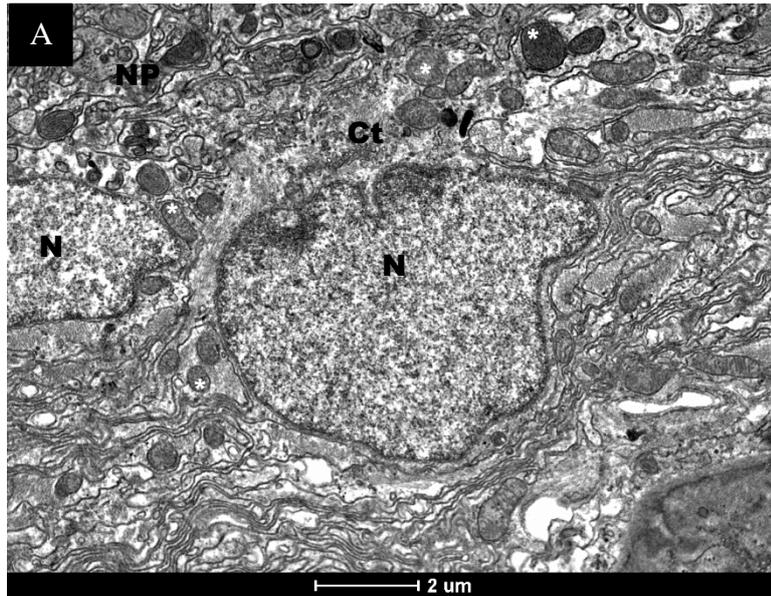


Figura 17: Ultraestrutura do núcleo estriado de camundongos Knock out (KOP55) mortos 11 dias após infusão MPTP. Imagens representativas de neurônio, neuropilo e glia, com alterações estruturais. (A) Imagem em maior aumento de corpo de neurônio com sinais de alterações estruturais, pode-se citar a fragmentação nuclear, mitocôndrias em estado de degeneração, presença de vacúolos no citoplasma e dilatação do complexo de Golgi. (B) Corpo celular neuronal em menor aumento, estruturas com sinais de degeneração. Abreviações: NF (núcleo fragmentado), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta preta (axônio), D (complexo de golgi dilatado), seta branca (sinapse), asterisco branco (mitocôndria normal), asterisco preto (mitocôndria em estado

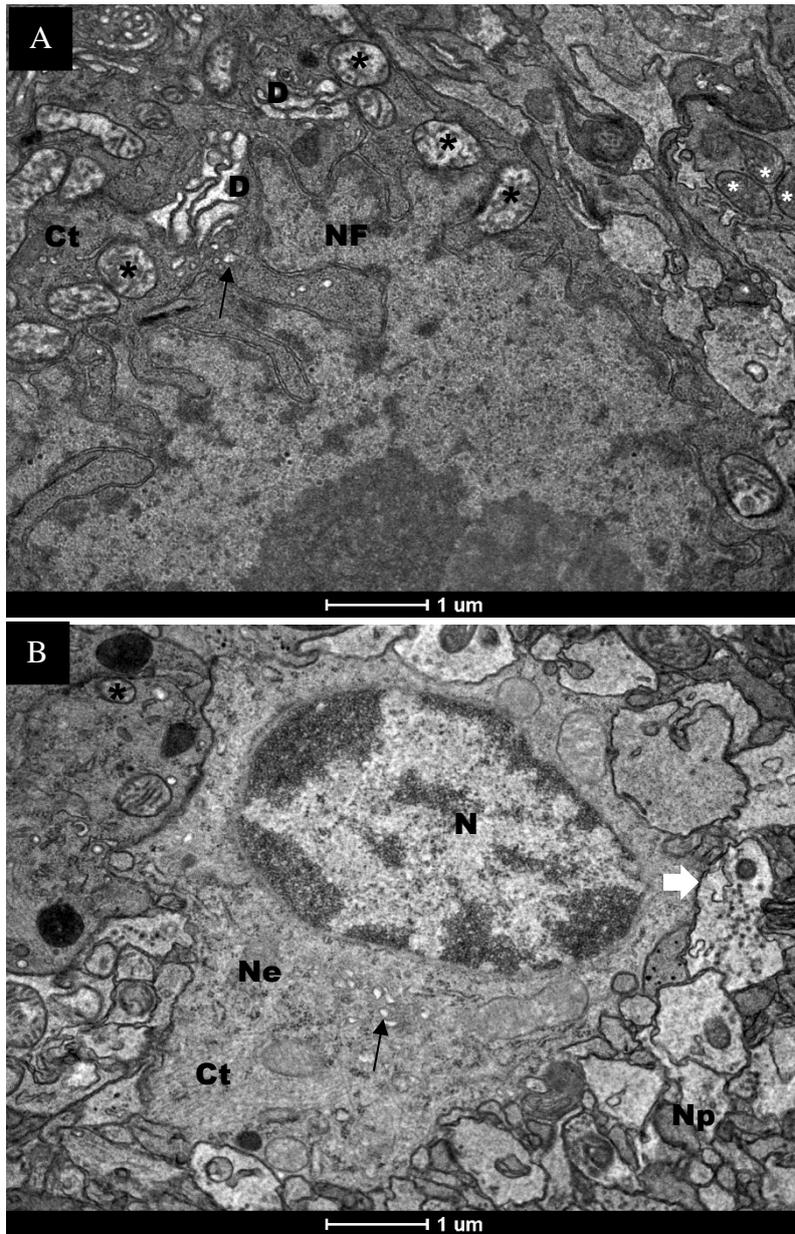


Figura 18: Ultraestrutura do Mesencéfalo Ventral de camundongos Knock out (KO p55) mortos 11 dias após infusão MPTP. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, com alterações estruturais. (A) Imagem em menor aumento onde é possível identificar sinais de alterações estruturais em um neurônio, como fragmentação nuclear, mitocôndrias em estado de degeneração e figuras de mielina. (B) e (C) Corpo celular neuronal em maior aumento e estruturas com sinais de degeneração. Abreviações: NF (núcleo fragmentado), Ne (neurônio), NP (neuropila), Ct (citoplasma), seta branca (sinapse), asterisco branco (mitocôndria normal), asterisco preto (mitocôndria em estado de degeneração), seta branca com borda (figuras de mielina).

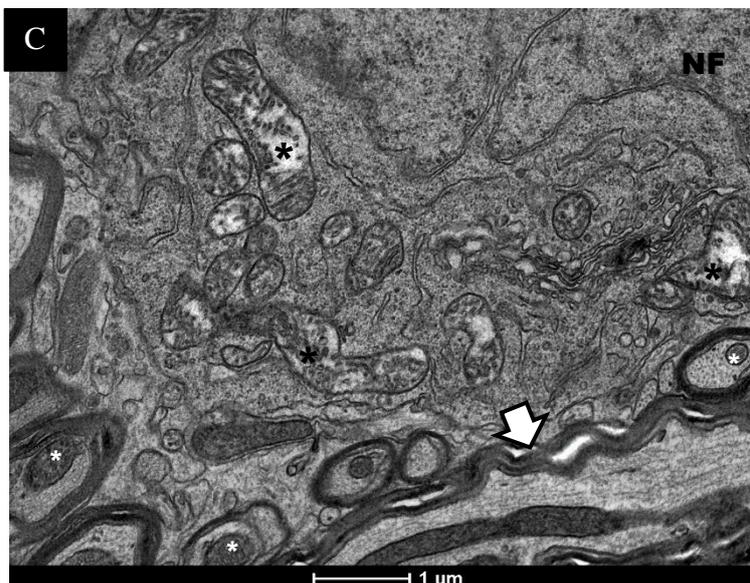
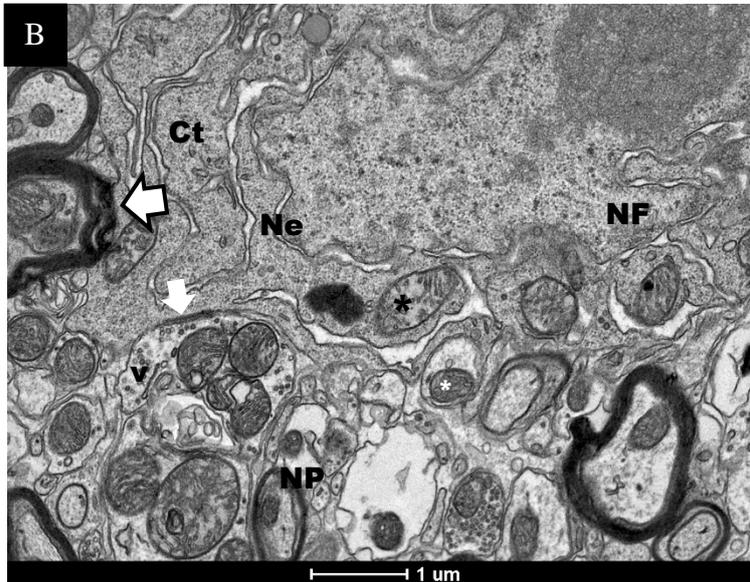
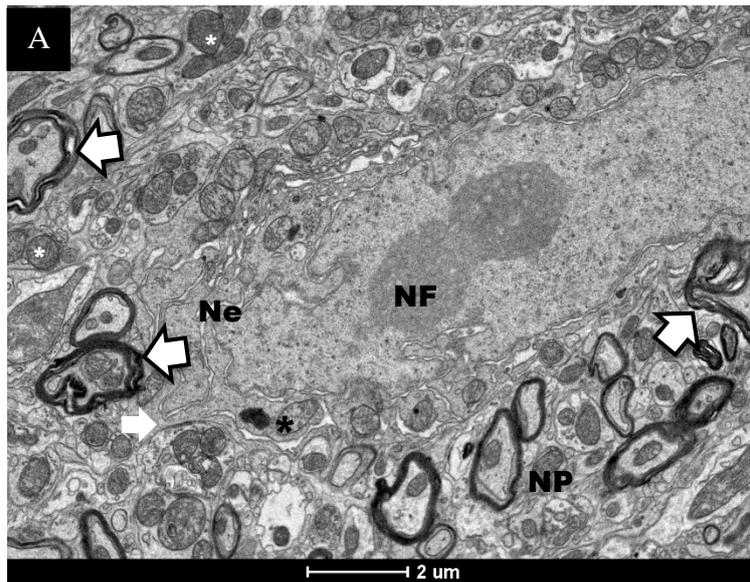
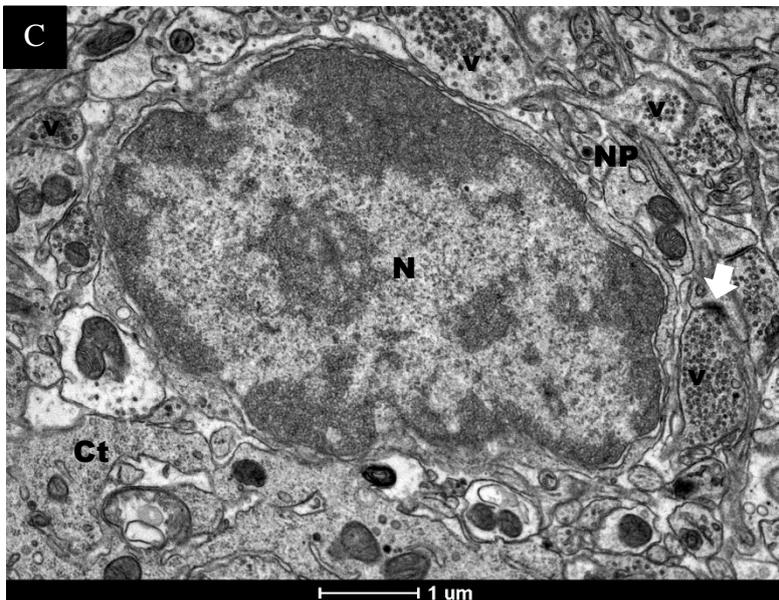
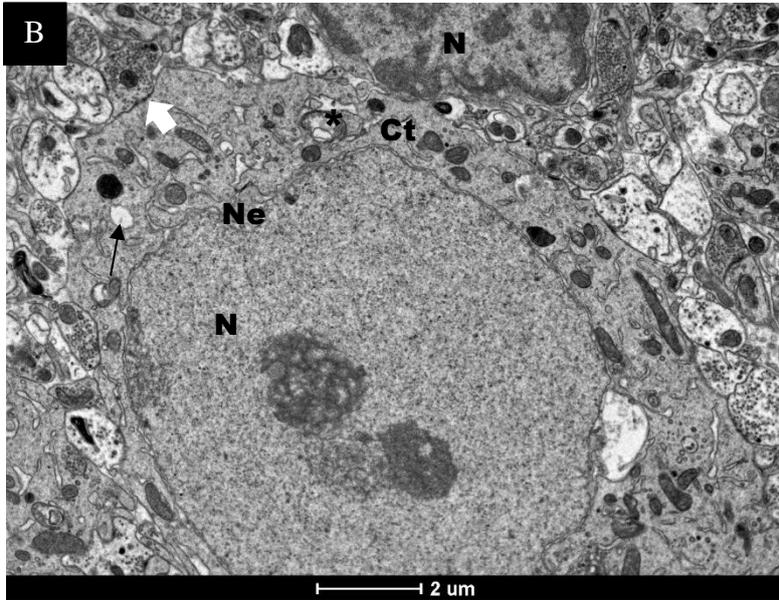
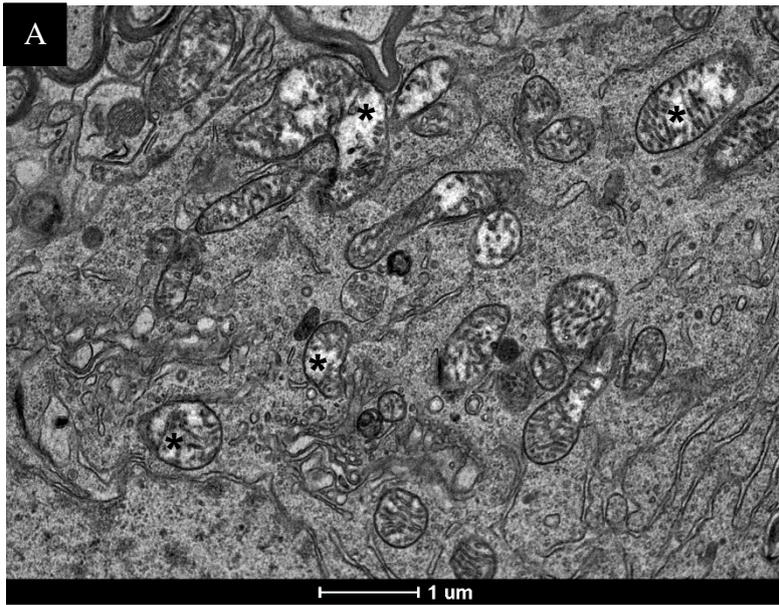


Figura 19: Ultraestrutura do Mesencéfalo Ventral de camundongos Knock out (KO p55) mortos 11 dias após infusão MPTP. Imagens representativas de neurônio, neurópilo e glia, com alterações estruturais. (A) Imagem em maior aumento onde é possível identificar sinais de alterações estruturais em mitocôndrias em corpo celular. (B) Corpo celular neuronal em maior aumento e estruturas com sinais de degeneração. (C) Célula da glia sem alterações aparentes. Abreviações: NF (núcleo fragmentado), Ne (neurônio), NP (neurópila), Ct (citoplasma), seta branca (sinapse), asterisco branco (mitocôndria normal), asterisco preto (mitocôndria em estado de degeneração), seta branca com borda (figuras de mielina), seta preta fina (vacúolos no citoplasma).



6 DISCUSSÃO

Neste estudo, buscou-se identificar alterações estruturais e funcionais no núcleo estriado e mesencéfalo ventral de camundongos C57BL/6, assim como na atividade locomotora e exploratória, aos 11 dias após infusão intranasal com MPTP. Nossos resultados indicam que nessa fase inicial já se observa um perfil de ansiedade em teste de campo aberto, associado à alteração de níveis de fatores neurotróficos e citocinas.

Em interessante revisão, Prediger e colaboradores (2012) compararam diferentes modelos de DP e, apesar da existência de algumas limitações, concluíram que o MPTP administrado via intranasal, em camundongos e ratos, mimetiza características clínicas da DP, sintomas não motores e motores, dependentes da dose e do esquema de administração. Prediger e colaboradores (2010) demonstraram que uma única infusão intranasal de MPTP em camundongos C57BL/6 se caracteriza como um modelo pré-clínico da DP, onde os sintomas assemelham-se aos observados durante a fase inicial da doença, caracterizados por alterações sensoriais, déficits de memória, sem grandes alterações motoras.

Em nosso trabalho também não observamos alteração da atividade locomotora aos 11 dias após infusão de MPTP.

Diferentemente dos resultados encontrados por Prediger e colaboradores (2010), que não encontraram alterações significativas relacionadas a ansiedade em camundongos no quinto dia após infusão intranasal de MPTP, mostramos que os animais apresentam comportamento ansioso quando submetidos ao teste de campo aberto, 11 dias após a infusão intranasal de MPTP. É importante ressaltar que as fases iniciais da DP são marcadas por várias alterações, incluindo transtornos de ansiedade (Schrag, 2004) e disfunção olfatória (Doty et al., 1988, 1995).

Sabe-se que existe envolvimento de citocinas no estabelecimento do quadro de ansiedade (Vogelzangs et al., 2016). Em nosso estudo, o comportamento ansioso dos camundongos submetidos à infusão intranasal com MPTP foi marcado por alterações nos níveis de citocinas e de fatores neurotróficos. Neste contexto, demonstramos um aumento nos níveis de IL-10 e IL-17 no mesencéfalo ventral dos camundongos submetidos à infusão intranasal com MPTP. Entretanto, apenas a IL-17 estava aumentada no núcleo estriado do mesmo grupo.

A IL-17 estimula macrófagos a apresentarem perfil pró-inflamatório de uma forma similar ao IFN- γ em células Th1 (Fietta & Delsante, 2009). Seu nível elevado no sistema

nigroestriatal, juntamente com o aumento de IL-10 no mesencéfalo ventral, área onde se encontra a substância negra, região alvo da DP, indica uma resposta inflamatória. Com possibilidade de ação atenuante da IL-10.

Também encontramos alterações nos níveis de fatores neurotróficos nos camundongos C57BL/6 submetidos à infusão de MPTP. Houve diminuição de BDNF no mesencéfalo ventral e aumento de NGF e BDNF no núcleo estriado. Nguyen e colaboradores (2009), através de estudo *in vitro*, demonstraram que o NGF e o BDNF desempenham papel neuroprotetor frente a estímulos neurotóxicos que são gatilhos em vias apoptóticas relevantes nas doenças neurodegenerativas.

Várias pesquisas relatam a neuroproteção dos fatores neurotróficos na DP. Diversos autores demonstraram que a expressão de BDNF está diminuída em modelos animais da DP (Lau et al., 2011; Tajiri et al., 2010; Wu et al., 2011) e também em cérebros de indivíduos (*postmortem*) afetados pela DP (Howells et al., 2000). Existem evidências de que a atividade física auxilie na restauração dos níveis de BDNF tanto em modelos animais (Lau et al., 2011; Smith & Zigmond, 2003; Tajiri et al., 2010; Wu et al., 2011) quanto em pacientes parkinsonianos (Ahlskog, 2011).

É aparente o envolvimento do NGF em transtornos neuropsiquiátricos, como a esclerose múltipla, doença de Alzheimer e a doença de Parkinson (Hellweg et al., 1998; Valenzuela et al., 2007, Ziegenhorn et al., 2007). Dentre outras funções, o NGF é responsável pela proteção contra a neurodegeneração, e também promove a sobrevivência de neurônios sensoriais primários, neurônios simpáticos e colinérgicos do gânglio basal (Shoval E Weizman, 2005). Em nosso trabalho, o nível dessa neurotrofina estava aumentada apenas no núcleo estriado dos camundongos C57bl/6 submetidos à infusão de intranasal de MPTP.

Em nosso trabalho não se observou alteração ultraestrutural no núcleo estriado e mesencéfalo ventral de ambos os grupos, controle e MPTP, sugerindo que o modelo de experimental de DP baseado em uma única infusão intranasal com MPTP em camundongos C57BL/6 forneça basicamente alterações funcionais aos 11 dias pós-infusão.

Nossos resultados preliminares obtidos com camundongos KO p55 [TNF- α 1 (- / -)] aos 11 dias pós-infusão intranasal com MPTP mostram que alterações neuronais significativas, tais como mitocôndrias intumescidas e degeneradas, fragmentação da cromatina, vacuolização citoplasmáticas e terminações nervosas com vacúolos e rarefação de organelas.

Usando camundongos TNF- α (-/-), Ferguer e colaboradores (2004) mostraram uma completa proteção da densidade de fibras-TH nos núcleos da base, com parcial proteção contra a depleção de dopamina. Entretanto, nem a ablação genética nem a inibição farmacológica de TNF- α conferiram proteção na substância negra. TNF- α (-/-) também exibiu reduzido extravasamento e melhor integridade da barreira hematoencefálica após a administração de MPTP (Zhao et al., 2007). Mudanças morfológicas foram observadas, com reduzido número de micróglia ativada em camundongos TNF- α (- / -) e também atenuada liberação de Il-1 β nos núcleos da base, porém com liberação normal na SN. Camundongos TNF- α (- / -) também mostraram uma atenuação no número de micróglia e astrócitos após administração de MPTP, havendo ainda mudanças morfológicas típicas de ativação em ambos os tipos celulares (Barcia et al., 2012).

Vários grupos investigaram o papel dos receptores de TNF frente a indução da neurodegeneração induzida pelo MPTP. De acordo com Sriram e colaboradores (2002; 2006), camundongos duplamente Knock out para os receptores TNF [TNF- α 1 (-/-) / TNF- α 2 (-/-)] foram protegidos contra a neurotoxicidade induzida pelo MPTP. O aumento da expressão de TNF- α microglial induzida por MPTP precede a desnervação dopaminérgica estriatal e astrogliose, processo no qual foi atenuado em camundongos [TNF- α 1 (-/-) e TNF- α 2 (-/-)].

Após uma dose aguda de MPTP, Rousselet e colaboradores (2002) não observaram proteção em neurônios dopaminérgicos de camundongos selvagens, TNF- α 1 (-/-), TNF- α 2 (-/-). Entretanto esses camundongos [TNF- α 1 (- / -) / TNF- α 2 (- / -)] mostraram diminuída habilidade no rotarod (teste de avaliação motora) e um declínio nos níveis de dopamina estriatal. Utilizando um regime crônico de administração de MPTP, Leng e colaboradores (2005) também não observaram diferenças dos níveis de dopamina estriatal e metabólitos entre os camundongos selvagens, TNF- α 1 (- / -) e os TNF- α 2 (-/-), realçando a influência da dose e do regime sobre a degeneração induzida por MPTP no sistema nigroestriatal.

7 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Nossos resultados permitem concluir a infusão intranasal de MPTP (1mg/narina) em camundongos C57BL/6 resultou, aos 11 dias após infusão, em:

- i) comportamento característico de ansiedade em teste de campo aberto;
- ii) elevação dos níveis de IL-10 e IL-17 no mesencéfalo ventral e de IL-17 no núcleo estriado;
- iii) diminuição dos níveis de BDNF no mesencéfalo ventral;
- iv) aumento dos níveis de BDNF e NGF no núcleo estriado;
- v) não resultou em alterações estruturais ultraestruturais no mesencéfalo ventral e núcleo estriado.

Dados preliminares obtidos em camundongos KO TNF p55 mostraram alterações degenerativas no mesencéfalo e estriado aos 11 dias após infusão com MPTP.

Nossos resultados indicam que o modelo utilizado pode ser associado à fase pré-clínica da DP e abre novas perspectivas para estudo de fatores que interferem com o desenvolvimento dessa doença.

8 REFERÊNCIAS

Aron, L., Klein, R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. (2011). *Trends Neurosci.*, 34, 88–100.

Ahlskog, J.E. (2011) Does Vigorous Exercise Have A Neuroprotective Effect In Parkinson Disease? *Neurology*. 77(3), 288-94.

Anrather, J., Racchumi, G., Iadecola C. (2006) NF-Kb Regulates Phagocytic NADPH Oxidase By Inducing The Expression Of Gp91phox. *Journal Of Biological Chemistry*, 281(9), 5657-5667.

Arduino, D. M., Esteves, A. R., Oliveira, C. R., And Cardoso, S. M. (2010). Mitochondrial Metabolism Modulation: A New Therapeutic Approach For Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*. 9, 105-119.

Associação Brasil Parkinson, disponível em: <[Http://Www.Parkinson.Org.Br/Firefox/Index.Html](http://www.Parkinson.Org.Br/Firefox/Index.Html)> [Acesso em 02/07/2016].

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

Ballard, P.A., Tetrad, J.W., Langston, J.W. (1985). Permanent Human Parkinsonism Due To 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): Seven Cases. *Neurology.*, 35(7), 949-56.

Barbosa, M.T., Caramelli, P., Maia, D.P., Cunningham, M.C., Guerra, H.L., Lima-Costa, M.F., Cardoso, F. (2006). Parkinsonism And Parkinson's Disease In The Elderly: A

- Community-Based Survey In Brazil (The Bambuí Study). *Movement Disorders*, 21(6), 800-8008.
- Barnett, E.M., Perlman, S. (1993). The Olfactory Nerve And Not The Trigeminal Nerve Is The Major Site Of CNS Entry For Mouse Hepatitis Virus, Strain JHM. *Virology* 194, 185-189.
- Barone, P., Antonini, A., Colosimo, C., Marconi, R., Morgante, L., Avarello, T.P., Bottacchi, E., Cannas, A., Ceravolo, G., Ceravolo, R., Cicarelli, G., Gaglio, R.M., Giglia, R.M., Iemolo, F., Manfredi, M., Meco, G., Nicoletti, A., Pederzoli, M., Petrone, A., Pisani, A., Pontieri, F.E., Quatralo, R., Ramat, S., Scala, R., Volpe, G., Zappulla, S., Bentivoglio, A.R., Stocchi, F., Trianni, G., Dotto, P.D. (2009). The PRIAMO study: a multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 24, 1641–1649.
- Baydyuk, M.; Nguyen, M.T.; Xu, B. (2011). Chronic deprivation of TrkB signaling leads to selective late-onset nigrostriatal dopaminergic degeneration. *Exp. Neurol.* 2011, 228, 118–125.
- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., And Freeman, B. A. (1990). Apparent Hydroxyl Radical Production By Peroxynitrite: Implications For Endothelial Injury From Nitric Oxide And Superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1620-1624.
- Bekris, L.M., Mata, I.F., Zabetian, C.P. (2010). The Genetics Of Parkinson Disease. *J Geriatr Psychiatry Neurol.* 23(4), 228-42.
- Bezard, E., Gross, C.E., Fournier, M.C., Dovero, S., Bloch, B., Jaber, M. (1999). Absence Of MPTP-Induced Neuronal Death In Mice Lacking The Dopamine Transporter. *Exp. Neurol.* 155, 268-273.

- Block, M.L., Hong, J.S., (2005). Microglia And Inflammation-Mediated Neurodegeneration: Multiple Triggers With A Common Mechanism. *Prog. Neurobiol.*, 76, 77-98.
- Boka G., Anglade P., Wallach D., Javoy-Agid F., Agid Y. and Hirsch E. C. (1994). Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* 172, 151– 154.
- Bové, J., & Perier, C. (2012). Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211, 51–76.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H., Del Tredici, K. (2003). Staging Of Brain Pathology Related To Sporadic Parkinson's Disease. *Neurobiol. Aging*, 24, 197-211.
- Braak, H., Ghebremedhin, E., Rub, U., Bratzke, H. & Del Tredici, K. (2004). Stages In The Development Of Parkinson's Disease-Related Pathology. *Cell Tissue Res.* 318, 121-134.
- Branco, D.M., Daniela, M., Arduino, A., Esteves, R., Diana, F. F., Silva, S. M. C., Oliveira, C. R. (2010). Cross-Talk Between Mitochondria And Proteasome In Parkinson's Disease Pathogenesis. *Frontiers In Aging Neuroscience*, 17(2), 1-10.
- Bredt, D. S., Hwang, P. M., Glatt, C. E., Lowenstein, C., Reed, R. R., Snyder, S. H. (1991). Cloned And Expressed Nitric Oxide Synthase Structurally Resembles Cytochrome P-450 Reductase. *Nature*, 351, 714-718.
- Busse, K., Heilmann, R., Kleinschmidt, S., Abu-Mugheisib, M., Hoppner, J., Wunderlich, C., Gemende, I., Kaulitz, L., Wolters, A., Benecke, R., Walter, U. (2012). Value of combined midbrain sonography, olfactory and motor function assessment in the differential diagnosis of early Parkinson's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 83, 441–447.

- Cardoso, S. M., Esteves, A. R., Arduíno, D. M., Domingues, A. F., Oliveira, C. R. (2009). The Crucial Role Of Mitochondria In Parkinson's Disease. *Recent Res. Devel. Neurosci.* 3, 43-84.
- Casjens, S., Eckert, A., Woitalla, D., Ellrichmann, G., Turewicz, M., Stephan, C., Eisenacher, M., May, C., Meyer, H.E., Bruning, T., Pesch, B., 2013. Diagnostic value of the impairment of olfaction in Parkinson's disease. *PloS One* 8, e64735.
- Chen, L.W., Zhang, J.P., Kwok -Yan Shum, D., Chan, Y.S. (2006). Localization of nerve growth factor, neurotrophin-3, and glial cell line-derived neurotrophic factor in nestin-expressing reactive astrocytes in the caudate-putamen of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/Bl mice. *J. Comp. Neurol.* 497, 898–909.
- Chen, L.W., Hu, H.J., Liu, H.-L., Yung, K.K.L., Chan, Y.S. (2004). Identification of brain-derived neurotrophic factor in nestin-expressing astroglial cells in the neostriatum of 1-methyl-4-phenyl- 1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice. *Neuroscience*, 126, 941–953.
- Del Zompo, M., Piccardi, M. P., Ruiu, S., Quartu, M., Gessa, G. L., Vaccari, A. (1993). Selective MPP⁺ Uptake Into Synaptic Dopamine Vesicles: Possible Involvement In MPTP Neurotoxicity. *Br. J. Pharmacol.*, 109, 411-414.
- Cao, J.J., Li, K.S., Shen, Y.Q. (2011). Activated immune cells in Parkinson's disease. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 6, 323-329.
- Christensen, J.A., Frandsen, R., Kempfner, J., Arvastson, L., Christensen, S.R., Jennum, P., Sorensen, H.B. (2012). Separation of Parkinson's patients in early and mature stages from control subjects using one EOG channel. In: Conference proceedings Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference*, 2941–2944

- Crabbe, J., Wahlsten, D., Dudek. (1999). Genetics Of Mouse Behavior: Interactions With Laboratory Environment. *Science* 284, 1670-1672
- Crotty, S., Fitzgerald, P., Tuohy, E., Harris, D.M., Fisher, A., Mandel, A., Bolton, A.E., Sullivan, A.M., Nolan, Y. (2008). Neuroprotective Effects Of Novel Phosphatidylglycerol-Based Phospholipids In The 6-Hydroxydopamine Model Of Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurosci.* 27, 294-300.
- Dauer W. & Przedborski S. (2003). Parkinson's Disease: Mechanisms And Models. *Neuron.* 39, 889-909.
- Depino, A. M., Earl, C., Kaczmarczyk, E., Ferrari, C., Besedovsky, H., Del Rey, A., Pitossi, F.J., Oertel, W.H. (2003). Microglial Activation With Atypical Proinflammatory Cytokine Expression In A Rat Model Of Parkinson's Disease. *Eur. J. Neurosci.* 18, 2731-2742.
- Dick, F.D., (2006). Parkinson's Disease And Pesticide Exposures. *Br. Med. Bull.*, 79-80.
- Dickson, D.W., Lee, S.C., Mattiace, L.A., Yen, S.H., Brosnan, C. (1993). Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia*,7, 75-83
- Dorsey, E.R., Constantinescu, R., Thompson, J. P., Biglan, K.M., Holloway, R. G., Kieburtz K., Marshall, F. J., Ravina, B. M., Schifitto, G., Siderowf, A., Tanner, C. M. (2007). Projected Number Of People With Parkinson Disease In The Most Populous Nations, 2005 Through 2030. *Neurology*, 68, 384-386.
- Doty, R. L. (2008). The Olfactory Vector Hypothesis Of Neurodegenerative Disease: Is It Viable? *Ann. Neurol* 2008, 63, 7-15.

- Doty, R. L., Bromley, S. M., Stern, M.B. (1995). Olfactory Testing As An Aid In The Diagnosis Of Parkinson's Disease: Development Of Optimal Discrimination Criteria. *Neurodegeneration* 4, 93–97.
- Doty, R. L., Deems, D., Stellar, S. (1988). Olfactory Dysfunction In Parkinson's Disease: A General Deficit Unrelated To Neurologic Signs, Disease State, Or Disease Duration. *Neurology*,38, 1237-1244.
- Doty, R.L. (2012a). Olfaction in Parkinson's disease and related disorders. *Neurobiol. Dis.* 46, 527–552.
- Doty, R.L. (2012b). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nat. Rev. Neurol.* 8, 329–339.
- Duty, S., & Jenner, P. (2011). Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *British journal of pharmacology*, 164(4), 1357–91.
- Elbaz, A., Carcaillon, L., Kab, S., Moisan, F. (2016). Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurology*, 172, 14-26.
- Eriksen, J. L., Wszolek, Z., Petrucelli, L. (2005). Molecular Pathogenesis Of Parkinson Disease. *Arch. Neurol.*, 62, 353-357.
- Ferger, B., Leng, A., Mura, A., Hengerer, B., Feldon, J. (2004). Genetic ablation of tumor necrosis factor-alpha (TNF-a) and pharmacological inhibition of TNF-synthesis attenuates MPTP toxicity in mouse striatum. *Journal of Neurochemistry*, 89, 822–833.
- Ferrer, I., Martinez, A., Blanco, R., Dalfo, E., Carmona, M. (2011). Neuropathology Of Sporadic Parkinson Disease Before The Appearance Of Parkinsonism: Preclinical Parkinson Disease. *J. Neural Transm.* 118, 821-839.

- Fietta, P., Delsante, G. (2009). The Effector T Helper Cell Triade. *Riv. Biol.*, 102(1), 61-74.
- Fillit, H., Ding, W. H., Buee, L., Kalman, J., Altstiel, L., Lawlor, B., Wolf-Klein, G. (1991) Elevated circulating tumor necrosis factor levels in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 129, 318–320
- Fonck, C., Baudry, M. (2003). Rapid Reduction Of ATP Synthesis And Lack Of Free Radical Formation 1 By MPP In Rat Brain Synaptosomes And Mitochondria 1. *Brain Research*, 975, 214-221.
- Forno, L. S. (1996). Neuropathology Of Parkinson's Disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 55, 259-272.
- Gainetdinov, R. R., Fumagalli, F., Jones, S.R., Caron, M.G. (1997). Dopamine Transporter Is Required For In Vivo MPTP Neurotoxicity: Evidence From Mice Lacking The Transporter. *J. Neurochem.*, 69,1322-1325.
- Gao, H. M., Liu, B., Zhang, W., Hong, J. S. (2003). Critical Role Of Microglial NADPH Oxidase-Derived Free Radicals In The In Vitro MPTP Model Of Parkinson's Disease. *FASEB Journal*, 17 (13), 1954-1956.
- Gao, H. M., Hong, J. S. (2008). Why Neurodegenerative Diseases Are Progressive: Uncontrolled Inflammation Drives Disease Progression. *Trends Immunol.* 29, 357-365.
- Gallagher, D.A., Schrag, A., (2012). Psychosis, apathy, depression and anxiety in Parkinson's disease. *Neurobiology Dis.*, 46, 581–589.
- Garcia, E., Rios, C., Sotelo, J. (1992). Ventricular injection of nerve growth factor increases dopamine content in the striata of MPTP-treated mice. *Neurochem. Res.*, 17, 979–982.

- Garthwaite, J., Charles, S. L., ChessWilliams, R. (1988). Endotheliumderived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, 336, 385–388.
- Gerecke, K.M., Jiao, Y., Pagala, V., Smeyne, R.J. (2012). Exercise does not protect against MPTP-induced neurotoxicity in BDNF haploinsufficient mice. *Plos One*, 7, e43250.
- Giladi N. (2009). Mobility And Exercise In Movement Disorders. *Parkinsonism And Related Disorders*. 15 (S3), 46-48.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., And Gage, F. H. (2010). Mechanisms Underlying Inflammation In Neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-934.
- Goetz, C. G. The history of Parkinson’s disease: early clinical descriptions and neurological therapies. (2011). *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 1(1), a008862.
- Gregersen, R., Lambertsen, K., Finsen, B. (2000). Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 20, 53–65.
- Haaxma, C. A., Bloem, B. R., Borm, G. F., Oyen, W. J. G., Leenders, K. L., Eshuis, S., Booij, J., Dluzen, D. E., Horstink, M. W. I. M. (2007). Gender Differences In Parkinson’s Disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 78, 819-824.
- Hamre, K., Tharp, R., Poon, K., Xiong, X., Smeyne, R. J. (1999) Differential Strain Susceptibility Following 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahy-Dropyridine (MPTP) Administration Acts In An Autosomal Dominant Fashion: Quantitative Analysis In Seven Strains Of Musculus. *Brain Res.*, 828, 91-103.
- Hardy J. (2010). Genetic Analysis Of P Athways To Parkinson Disease. *Neuron*, 68(2), 201-206.

- Hastings, L., Evans, J. E. (1991). Olfactory Primary Neurons As A Route Of Entry For Toxic Agents Into The CNS. *Neurotoxicology*, 12, 707-714.
- Hegarty, S.V.; O'Keeffe, G.W.; Sullivan, A.M. (2014). Neurotrophic factors: From neurodevelopmental regulators to novel therapies for Parkinson's disease. *Neural Regen. Res.* 9, 1708–1711.
- Hawkes, C. H., Del Tredici, K., Braak, H. (2007). Parkinson's Disease: A Dual-Hit Hypothesis. *Neuropathology And Applied Neurobiology*, 33, 599-614.
- Heikkila, R. E., Cabbat, F. S., Manzino, L., Duvoisin, R. C. (1984). Effects Of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,5,6Tetrahydropyridine On Neostriatal Dopamine In Mice. *Neuropharmacology*, 23, 711-713.
- Hellweg, R., Von Richthofen, S., Anders, D., Baethge, C., Röpke, S., Hartung, H. D., Gericke, C. A. (1998). The Time Course Of Nerve Growth Factor Content In Different Neuropsychiatric Diseases - A Unifying Hypothesis. *J. Neural Transm.*, 105(8-9): 871-903.
- Herrup, K. (2010). Reimagining Alzheimer's Disease - An Age-Based Hypothesis. (2010). *J. Neurosci.* 30, 16755–16762.
- Hindle, J. (2010). Ageing, Neurodegeneration And Parkinson's Disease. *Age Ageing* 39, 156-161.
- Hirsch, E. C., Hunot, S., Hartmann, A. (2005). Neuroinflammatory Processes In Parkinson's Disease. *Parkinsonism And Related Disorders*, 11 (S9–S15).
- Hirsch, E. C., Hunot, S., (2009). Neuroinflammation In Parkinson's Disease: A Target For Neuroprotection? *Lancet Neurol.*, 8, 382-397.

- Hornykiewicz, O. (2016). The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. *J Neural Transm.*, 70, 9-15.
- Howells, D. W., Porritt, M. J., Wong, J. Y., Batchelor, P. E., Kalnins, R., Hughes, A. J., Donnan, G. A. (2000). Reduced BDNF Mrna Expression In The Parkinson's Disease Substantia Nigra. *Exp Neurol.*, 166(1), 127–135.
- Hunot, S., Dugas, N., Faucheux, B., Hartmann, A., Tardieu, M., Debre, P., Agid, Y., Dugas, B., Hirsch, E. C. (1999). Fc ϵ rii/CD23 Is Expressed In Parkinson's Disease And Induces, In Vitro, Production Of Nitric Oxide And Tumor Necrosis Factor-Alpha In Glial Cells. *J. Neurosci.*, 19, 3440-3447.
- Hunot, S., Bruggs, B., Richard, D., Michel, P.P., Muriel, M.P., Ruberg, M. (2003). Nuclear translocation of NF-kappa B is increased in dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 2875-80.
- Hyman, C.; Hofer, M.; Barde, Y.A.; Juhasz, M.; Yancopoulos, G.D.; Squinto, S.P.; Lindsay, R.M. (1991). BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*, 350, 230–232.
- Jankovic, J., (2008). Parkinson's Disease: Clinical Features And Diagnosis. *J. Neurol. Neurosurg Psychiatry*, 79, 368-376.
- Jenner, P., (2003). Oxidative Stress In Parkinson's Disease. *Ann. Neurol.*, 53 (S3), 26-36.
- Jellinger, K. A. (1999). Post Mortem Studies In Parkinson's Disease - Is It Possible To Detect Brain Areas For Specific Symptoms? *J. Neural Transm.* 56, 1-29.
- Keath, J. R., Iacoviello, M. P., Barrett, L. E., Mansvelder, H. D., McGehee, D. S. (2007). Differential Modulation By Nicotine Of Substantia Nigra Versus Ventral Tegmental Area Dopamine Neurons. *Neurophysiol* 98, 3388-3396.

- Khedr, E.M., El Fetoh, N.A., Khalifa, H., Ahmed, M.A., El Beh, K.M. (2013). Prevalence of non motor features in a cohort of Parkinson's disease patients. *Clin. Neurol. Neurosurg.* 115, 673–677.
- King, L. A., Horak, F. B. (2009). Delaying Mobility Disability In People With Parkinson Disease Using A Sensorimotor Agility Exercise Program. *Phys. Ther.*, 89(4), 384-93.
- Kim, W. G., Mohny, R. P., Wilson, B., Jeohn, G. H., Liu, B., Hong, J. S. (2000). Regional Difference In Susceptibility To Lipopolysaccharide-Induced Neurotoxicity In The Rat Brain: Role Of Microglia. *J. Neurosci.* 20, 6309-6316.
- Kurtis, M.M., Rodriguez-Blazquez, C., Martinez-Martin, P. (2013). Relationship between sleep disorders and other non-motor symptoms in Parkinson's disease. *Park. Relat. Disord*
- Kwakkel, G., De Goe, C. J., Van Wegen, E. E. (2007). Impact Of Physical Therapy For Parkinson's Disease: A Critical Review Of The Literature. *Parkinsonism Relat. Disord.*, 13(S3), 478–487.
- Langston, J. W. (1985). MPTP Neurotoxicity: An Overview And Characterization Of Phases Of Toxicity. *Life Sci.*, 36, 201-206.
- Langston, J. W., Ballard, P., Tetrud, J. W., Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism In Humans Due To A Product Of Meperidine-Analog Synthesis. *Science*, 219, 979-980.
- Langston, J. W., Forno, L. S., Tetrud, J., Reeves, A. G., Kaplan, J. A., Karluk, D. (1999). Evidence Of Active Nerve Cell Degeneration In The Substantia Nigra Of Humans Years After 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine Exposure. *Ann. Neurol.*, 46, 598-605.

- Lau, Y.S., Patki, G., Das-Panja, K., Le, W., Ahmad, S.O. (2011). Neuroprotective effects and mechanisms of exercise in a chronic mouse model of Parkinson's disease with moderate neurodegeneration. *Eur J Neurosci.*, 33(7), 1264–1274.
- Le, W., Chen, S., Jankovic, J. (2009). Etiopathogenesis Of Parkinson Disease: A New Beginning? *The Neuroscientist*, 15 (1), 28-35.
- Levy, G. (2007). The Relationship Of Parkinson Disease With Aging. *Arch. Neurol.*, 64(9), 1242-1246.
- Liu, B. & Hong, J. S. (2003). Role Of Microglia In Inflammation-Mediated Neurodegenerative Diseases: Mechanisms And Strategies For Therapeutic Intervention. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 1-7.
- Lipton, S. A., Choi, Y. B., Pan, Z. H., Lei, S. Z., Chen, H. S., Sucher, N. J., Loscalzo, J., Singel, D. J., And Stamler, J. S. (1993). A Redox-Based Mechanism For The Neuroprotective And Neurodestructive Effects Of Nitric Oxide And Related Nitroso-Compounds. *Nature* 364, 626– 632.
- Long-Smith, C. M., Collins, L., Toulouse, A., Sullivan, A. M., Nolan, Y. M. (2010). Interleukin-1beta Contributes To Dopaminergic Neuronal Death Induced By Lipopolysaccharide-Stimulated Rat Glia In Vitro. *J. Neuroimmunol.* 226, 20-26.
- Mangano, E. N., Hayley, S. (2009). Inflammatory Priming Of The Substantia Nigra Influences The Impact Of Later Paraquat Exposure: Neuroimmune Sensitization Of Neurodegeneration. *Neurobiology Of Aging*, 30 (9), 1361-1378.
- Martinez-Martin, P., Rodriguez-Blazquez, C., Kurtis, M.M., Chaudhuri, K.R. (2011). The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 26, 399–406.

- Maslah, E., LiCastro, F. (2000). Neuronal and synaptic loss, reactive gliosis, microglial response, and induction of the complement cascade in Alzheimer's disease. *Neurodegenerative dementias*, 131–146.
- Meredith, G. E., Kang, U. J. (2006). Behavioral Models Of Parkinson's Disease In Rodents: A New Look At An Old Problem. *Mov. Disord.*, 21, 1595-606.
- Merrill, J. E. (1992). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in multiple sclerosis and central nervous system acquired immunodeficiency syndrome. *J. Immunother.* 12, 167–170
- Mogi, M., Harada, M., Kondo, T., Riederer, P., Inagaki, H., Minami, M., Nagatsu, T. (1994) Interleukin 1-Beta, Interleukin-6, Epidermal Growth Factor And Transforming Growth Factor-Alpha Are Elevated In The Brain From Parkinsonian Patients. *Neurosci. Lett.*, 180 (2), 147-150.
- Munoz, M., Boutros-Toni, F., Preux, P. M., Chartier, J. P., Ndzanga, E., Boa, F., Cruz, M. E., Vallat, J. M., Dumas, M. (1995). Prevalence Of Neurological Disorders In Haute-Vienne Department (Limousin Region France). *Neuroepidemiology*, 14(4), 193-198.
- Nakamura, T. & Lipton, S. A. (2009). Cell Death: Protein Misfolding And Neurodegenerative Diseases. *Apoptosis* 14, 455-468.
- Nguyen, N., Lee, S. B., Lee, Y. S., Lee, K. H., Ahn, J. Y. (2009). Neuroprotection By NGF And BDNF Against Neurotoxin-Exerted Apoptotic Death In Neural Stem Cells Are Mediated Through Trk Receptors, Activating PI3-Kinase And MAPK Pathways. *Neurochem. Res.*, 34(5), 942-951.
- OMS, Global Burden Disease, Death By Cause Estimates For 2008, 2008.

- Parkinson, J. (2002). An Essay On The Shaking Palsy. 1817. The *Journal Of Neuropsychiatry And Clinical Neurosciences*, 14(2), 223-36.
- Peeraully, T., Yong, M.H., Chokroverty, S., Tan, E.K. (2012). Sleep and Parkinson's disease: a review of case-control polysomnography studies. *Mov. Disord.* 27, 1729–1737
- Perry, V. H., Cunningham, C., Holmes, C. (2007). Systemic Infections And Inflammation Affect Chronic Neurodegeneration. *Nature Reviews Immunology*, 7 (2): 161-167.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A., Holmes, C., (2010). Microglia In Neurodegenerative Disease. *Nat. Rev. Neurol.* 6, 193-201.
- Pfeiffer, R.F. (2012). Autonomic dysfunction in Parkinson's disease. *Expert Rev. Neurother.* 12, 697–706.
- Podhorna, J., Brown, R.E. (2002). Strain differences in activity and emotionality do not account for differences in learning and memory performance between C57BL/6 and DBA/2 mice. *Genes. Brain. Behav.*, 1(2), 96-110.
- Prediger, R. D., Aguiar, A. S., Rojas-Mayorquin, A. E., Figueiredo, C. P., Matheus, F. C., Ginestet, L., Chevarin, C., Bel, E. D., Mongeau, R., Hamon, M., Lanfumey, L., Raisman-Vozari, R. (2010). Single Intranasal Administration Of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine In C57BL/6 Mice Models Early Preclinical Phase Of Parkinson's Disease. *Neurotox Res.*, 17 (2), 114-129.
- Prediger, R. D. S., Aguiar, A. S., Matheus, F. C., Walz, R., Antoury, L., RaismanVozari, R., & Doty, R. L. (2012). Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. *Neurotoxicity research*, 21(1), 90–116.

- Prediger, R.D.S, Aguiar, A.S., Moreira, E.L.G, Matheus, F.C., Castro, A.F.C., Walz, R., De Bem, F.D., Latini, A., Tasca, C.I., Farina, M., Raisman-Vozari, R. (2011). The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's disease. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 1-19.
- Pringsheim, T., Jette, N., Frolkis, A., Steeves, T. D. L. (2014). The Prevalence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Movement Disorders*, 29 (13), 1583-1590.
- Przedborski, S. (2005). Pathogenesis Of Nigral Cell Death In Parkinson's Disease. *Parkinsonism And Related Disorders*, 11, S3-S7, 2005.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Djaldetti, R., Liberatore, G., Vila, M., Vukosavic, S., Almer, G (2000). The Parkinsonian Toxin MPTP: Action And Mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 16(2), 135-142.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Naini, A. B., Jakowec, M., Petzinger, G., Miller, R., Akram, M. (2001). The Parkinsonian Toxin 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A Technical Review Of Its Utility And Safety. *J. Neurochem.*, 76(5), 1265-1274.
- Ransohoff, R. M., Glabinski, A., Tani, M. (1996). Chemokines in Immune-mediated Inflammation of the Central Nervous System. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 7 (1), 35-46.
- Reijnders, J.S., Ehrt, U., Weber, W.E., Aarsland, D., Leentjens, A.F. (2008). A systematic review of prevalence studies of depression in Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 23, 183-189.

- Ribeiro, R.M. alterações comportamentais, estruturais e níveis de fatores neurotróficos e citocinas em modelo experimental de parkinsonismo: efeitos do exercício físico. (2013). Universidade Federal de Minas Gerais, dissertação, 132p.
- Rijk, M.C., Breteler, M. M., Graveland, G. A., Ott, A., Grobbee, D. E., van der Meché, F. G., Hofman, A. (1995). Prevalence Of Parkinson's Disease In The Elderly: The Rotterdam Study. *Neurology*, 45(12), 2143-2146.
- Romenets, S.R., Gagnon, J.F., Latreille, V., Panniset, M., Chouinard, S., Montplaisir, J., Postuma, R.B. (2012). Rapid eye movement sleep behavior disorder and subtypes of Parkinson's disease. *Mov. Disord.* 27, 996–1003
- Rousselet, E., Callebert, J., Parain, K., Joubert, C., Hunot, S., Hartmann, A., et al. (2002). Role of TNF-alpha receptors in mice intoxicated with the parkinsonian toxin MPTP. *Exp. Neurol.*, 177: 183-92.
- Rousselet, E., Joubert, C., Callebert, J., Parain, K., Tremblay, L., Orioux, G., Launay J. M., Cohen-Salmon, C., Hirsch, E. C. (2003). Behavioral Changes Are Not Directly Related To Striatal Monoamine Levels, Number Of Nigral Neurons Or Dose Of Parkinsonian Toxin MPTP In Mice. *Neurobiol. Dis.*, 14, 218-228.
- Samii, A., Nutt, J. G., Ransom, B. R. (2004). Parkinson's Disease. *Lancet*, 363, 1783-1793.
- Savica, R., Rocca, A. W., Ahlskog, J. E. (2010). When Does Parkinson Disease Start? *Arch. Neurol.*, 67 (7), 798-801.
- Sawada, M., Imamura, K., Nagatsu, T. (2006). Role Of Cytokines In Inflammatory Process In Parkinson's Disease. *J. Neural Transm.* 70, 373-381.
- Sedelis, M., Schwarting, R. K., Huston, J. P. (2001). Behavioral Phenotyping Of The MPTP Mouse Model Of Parkinson's Disease. *Behav. Brain Res.*, 125,109-125.

- Schrag, A. (2004). Psychiatric Aspects Of Parkinson's Disease: An Update. *J. Neurol.* 251, 795-804.
- Schmidt, N., Ferger, B. (2001). Neurochemical findings In The MPTP Model Of Parkinson's Disease. *J. Neural Transm.* 108, 1263-1282.
- Shoval, G., Weizman, A. (2005). The Possible Role Of Neurotrophins In Pathogenesis And Therapy Of Schizophrenia. *Eur. Neuropsychopharmacol.*, 15(3), 319-329.
- Skaper, S.D. (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: An overview. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ, 846, 1–12.
- Smith, A. D., Zigmond, M. J. (2003). Can The Brain Be Protected Through Exercise? Lessons From An Animal Model Of Parkinsonism. *Exp. Neurol.* 184(1):31-39.
- Smeyne, R. J., Jackson-Lewis, V. The MPTP Model Of Parkinson's Disease Molecular. *Brain Research*, 134, 57-66.
- Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., And Goedert, M. (1997). Alpha-Synu- Clein In Lewy Bodies. *Nature*, 388, 839-840.
- Souto, M. O. Era Outono Em Barcelona: O Meu Encontro Com Mr. Parkinson. Editora Pathernon: Niterói, Rio De Janeiro, 2009.
- Souza, C.F.M., Almeida, H.C.P., Sousa, J.B., Costa, P.H., Silveira, Y.S.S., Bezerra, J.C.L. (2011). A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. *Neurocienc.*, 19(4), 718-723.
- Sriram, K., Benkovic, S. A., Hebert, M. A., Miller, D. B., and O'Callaghan, J. P. (2004). Induction of gp130-related cytokines and activation of JAK2/STAT3 pathway in astrocytes precedes up-regulation of glial fibrillary acidic protein in the 1-methyl-4-

- phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine model of neurodegeneration: Key signaling pathway for astrogliosis in vivo? *J. Biol. Chem.*, 279, 19936–19947
- Sriram, K., Benkovic, S., Miller, D., & O'Callaghan, J. (2002). Obesity exacerbates chemically induced neurodegeneration. *Neuroscience*, 115(4), 1335–1346.
- Sriram, K., Matheson, J.M., Benkovic, S.A, Miller, D.B., Luster, M.I., O'Callaghan, J.P. (2006). Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α . *The FASEB Journal*, 20, 670-682.
- Stoll, G., and Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog. Neurobiol.* 58, 233–247
- Suzuki K, Mizuno Y, Yamauchi Y, Nagatsu T, Mitsuo Y. (1992). Selective Inhibition Of Complex I By N-Methylisoquinolinium Ion And N-Methyl-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline In Isolated Mitochondria Prepared From Mouse Brain. *J Neurol Sci.*, 109 (2): 219-23.
- Tajiri N, Yasuhara T, Shingo T, (2010). Exercise Exerts Neuroprotective Effects On Parkinson'S Disease Model Of Rats. *Brain Research.* 2010;200-207.
- Takahashi, A., Kato, K., Makino, J., Shiroishi, T., Koide, T. (2006). Multivariate analysis of temporal descriptions of open-field behavior in wild-derived mouse strains. *Behav. Genet.*, 36(5):763-774.
- Tansey, M.G., Mccoy, M.K., Frank-Cannon, T.C. (2007) Neuroinflammatory Mechanisms In Parkinson's Disease: Potential Environmental Triggers, Pathways, And Targets For Early Therapeutic Intervention. *Experimental Neurology*, 208 (1): 1-25, 2007.

- Teive, H. A. G. (1998). O Papel De Charcot Na Doença De Parkinson. *Arquivos De Neuro-Psiquiatria*, 56(1), 141–145.
- Tjälve, H., Henriksson, J., Tallkvist, J., Larsson, B. S., Lindquist, N. G. (1996). Uptake Of Manganese And Cadmium From The Nasal Mucosa Into The Central Nervous System Via Olfactory Pathways In Rats. *Pharmacol. Toxicol.* 79, 347-356.
- Twelves, D., Perkins, K. S. M., Counsell, C. (2003). Systematic Review Of Incidence Studies Of Parkinson's Disease. *Mov. Disord.*, 18, 19-31.
- Uversky, V. N. (2004). Neurotoxicant-Induced Animal Models Of Parkinson's Disease: Understanding The Role Of Rotenone, Maneb And Paraquat In Neurodegeneration. *Cell Tissue Res.*, 318(1), 225-241.
- Valenzuela, M. J., Breakspear, M., Sachdev, P. (2007). Complex Mental Activity And The Aging Brain: Molecular, Cellular And Cortical Network Mechanisms. *Brain Res. Ver.* 56(1), 198-213.
- Vila, M., Jackson-Lewis, V., Guegan, C., Wu, D.C., Teismann, P., Choi, D.K., Tieu, K., Przedborski, S. (2001). The role of glial cells in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 14, 483–489.
- Videnovic, A., Golombek, D. (2013). Circadian and sleep disorders in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 243, 45–56.
- Vogelzangs, N., Jonge, P. D., Smit, J. H., Bahn, S., Penninx, B. W. (2016). Cytokine Production Capacity In Depression And Anxiety. *Transl. Psychiatry*, 6(5), 825.
- Wichmann, T. & De Long, M. R. (2003). Functional Neuroanatomy Of The Basal Ganglia In Parkinson'S Disease. *Adv. Neurol.* 91, 9-18.

- Weissmiller, A.M.; Wu, C. (2012). Current advances in using neurotrophic factors to treat neurodegenerative disorders. *Transl. Neurodegener.*, 1, 14.
- Wu, D. C., Teismann, P., Tieu, K., Vila, M., Jackson-Lewis, V., Ischiropoulos, H., Przedborski, S. (2003). NADPH Oxidase Mediates Oxidative Stress In The 1-Methyl-4-Phenyl-1, 2, 3, 6-Tetrahydropyridine Model Of Parkinson's Disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 100, 6145-6150.
- Wu, S.Y., Wang, T.F., Yu, L., Jen, C.J., Chuang, J.I., Wu, F.S., Wu, C.W., Kuo, Y.M. (2011). Running Exercise Protects The Substantia Nigra Dopaminergic Neurons Against Inflammation-Induced Degeneration Via The Activation Of BDNF Signaling Pathway. *Brain Behav. Immun.*, 25(1), 135-146.
- Wyss-Coray, T. & Mucke, L. (2002). Inflammation In Neurodegenerative Disease-A Double-Edged Sword. *Neuron*, 35, 419-432.
- Yang, Y. & Lu, B. (2009). Mitochondrial Morphogenesis, Distribution, And Parkinson Disease: Insights From PINK1. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 68(9), 953-963.
- Zhao, C., Ling, Z., Newman, M.B., Bhatia, A., Carveya, P.M. (2007). TNF- α knockout and minocycline treatment attenuates blood-brain barrier leakage in MPTP-treated mice. *Neurobiology of Disease*, 26, 36-46.
- Zatta, P., Favarato, M., Nicolini, M. (1993). Deposition Of Aluminum In Brain Tissues Of Rats Exposed To Inhalation Of Aluminum Acetylacetonate. *Neuroreport.*, 4, 1119-1122.
- Ziegenhorn, A., Schulte-Herbrüggen, O., Danker-Hopfe, H., Malbranc, M., Hartung, H., Anders, D., Lang, U., Steinhagethiessen, E., Schaub, R., Hellweg, R. (2007). Serum Neurotrophins - A Study On The Time Course And Influencing Factors In A Large Old Age Sample. *Neurobiol. Aging.*, 28(9), 1436-1445.