

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Priscila Maximiliana de Paula Ferreira

EFEITO DA INFLAMAÇÃO AGUDA SOBRE O
METABOLISMO CEREBRAL DAS PTERINAS E A
FISIOLOGIA MITOCONDRIAL EM MODELO GENÉTICO DE
DOENÇA DE PARKINSON

Dissertação submetida de Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica

Orientador: Alexandra Susana Latini

Co-orientador: Rodrigo Augusto da Silva

Florianópolis, 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Ferreira, Priscila Maximiliana de Paula

Efeito da inflamação aguda sobre o metabolismo cerebral das pterinas e a fisiologia mitocondrial em modelo genético de doença de parkinson / Priscila Maximiliana de Paula Ferreira ; orientadora, Alexandra Susana Latini ; coorientadora, Rodrigo Augusto da Silva. - Florianópolis, SC, 2015.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Parkinson. 3. Parkina. 4. Inflamação. 5. Mitocôndria. I. Latini, Alexandra Susana. II. Silva, Rodrigo Augusto da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

"Efeito da inflamação aguda sobre o metabolismo cerebral das pterinas e a fisiologia mitocondrial em um modelo genético da doença de parkinson"

Por

Priscila Maximiliana de Paula Ferreira

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (007/BQA/UFSC) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UFSC, composta pelos doutores:

Co-orientador:



Dr(a) Rodrigo Augusto da Silva (BQA/CCB/UFSC)

Banca examinadora:



Dr(a) Viviane Glaser (UFSC/campus Curitibaanos)



Dr(a) Nelson Gabilan (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Aderbal Silva Aguiar Junior (BQA/CCB/UFSC)



Prof(a), Dr(a), Carlos Peres Silva
Coordenador(a) do Programa de Pós Graduação em Bioquímica

Florianópolis, 27 de fevereiro de 2015.

Dedico esta dissertação a minha família, em especial aos meus pais Luiz e Ilcimara, pelo carinho, constante incentivo e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, ter me dado saúde e força para superar as dificuldades, por me guiar e mostrar os caminhos mesmo em horas incertas.

Agradeço aos meus pais Luiz e Ilcimara, por sempre acreditarem em mim, me apoiarem, e incentivarem a seguir em frente. Obrigada por todo amor e carinho e compreensão, isso foi essencial para que eu pudesse concluir mais essa etapa.

As minhas irmãs Ana Paula e Patricia, pelo incentivo, força e carinho. E aos meus sobrinhos Eduardo, José, Enzo e Davi por sempre alegrarem a minha vida pelo simples fato de sorrirem.

À minha orientadora, Prof^ª Alexandra Latini, que acompanhou meus passos desde a graduação, me incentivou e proporcionou muitos conhecimentos durante esse caminho. Obrigada por apostar em mim.

Ao meu coorientador Rodrigo Augusto da Silva, pela paciência e apoio para desenvolver essa dissertação.

Aos professores da pós-graduação pelos conhecimentos repassados.

Aos professores de Córdoba e Montevidéu, em especial a Gabriela Casanova do Departamento de Microscopia eletrônica da *Facultad de Ciencias de Montevideo* e a Prof^ª Ana Lucia De Paul do Departamento de Microscopia eletrônica da *Universidad Nacional de*

Córdoba, agradeço pela recepção, atenção e por todos os ensinamentos em microscopia eletrônica.

Aos meus colegas de laboratório: Aderbal, Aline, Anelise, Débora, Karina, Karine, Lucila, Roberta e Vivi obrigada por sempre me ajudarem.

Aos técnicos do LAMEB e do LCME da UFSC pelo auxílio metodológico.

A todos os meus amigos que estão sempre perto ou distantes, mas sempre presentes. Em especial a Mauricio, Mariana e Ana Júlia.

A todos que direta ou indiretamente, participaram desta fase da minha vida.

À CAPES pelo apoio financeiro.

“É preciso força pra sonhar e perceber
que a estrada vai além do que se vê”.

(Los Hermanos)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é uma doença progressiva crônico-degenerativa, considerada a segunda mais prevalente na população idosa. É caracterizada clinicamente por sintomas motores como tremor, rigidez, bradicinesia e instabilidade postural; e patologicamente pela perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra, redução da produção de dopamina, severo processo inflamatório e presença de corpos de Lewy. Embora a DP tenha sido considerada tradicionalmente por afetar indivíduos com idade superior a 50 anos, os sintomas também podem manifestar-se em pessoas com idade inferior aos 21 anos, sendo neste caso denominada de Parkinsonismo juvenil. Este tipo em especial ocorre esporadicamente ou como afecção hereditária autossômica associada com uma mutação no gene PARK2. Neste cenário o presente estudo teve como objetivo analisar a contribuição da neuroinflamação na fisiopatologia da doença de Parkinson juvenil em modelo genético por deleção do gene PARK2. Para este fim, camundongos C57BL/6 nocaute para PARK2 tiveram o estado neuroinflamatório induzido pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg). Quatro horas após a administração os animais realizaram testes comportamentais em campo aberto e interação social. Logo após os animais foram eutanasiados e o estrido foi coletado para posteriores análises. Nossos resultados mostram que o genótipo promove alteração cognitiva somente no parâmetro de memória social. No entanto, a administração aguda de LPS compromete a atividade locomotora e reduz a quantidade e a intensidade das visitas no teste de interação social. Ainda, o genótipo e a administração do LPS modulou a

expressão genica de importantes genes relacionados à síntese de BH4, ao metabolismo mitocondrial e plasticidade cerebral. Além disso, promoveu alterações morfológicas como aumento do número, redução da área e realocização subcelular na distância das mitocôndrias em relação à membrana nuclear. A análise conjunta dos dados nos permite concluir que a deleção do gene PARK2 promove maior susceptibilidade ao desenvolvimento dos danos causados pela resposta inflamatória, além de promover importantes alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares, as quais poderiam contribuir para fisiopatologia do Parkinsonismo juvenil.

ABSTRACT

Parkinson Disease (PD) is a chronic degenerative disease considered the second most prevalent in the elderly population. It is clinically characterized by motor symptoms such as tremor, rigidity, bradykinesia and postural instability; and pathologically by loss of dopaminergic neurons of the substantia nigra, reduction of the dopamine production, severe inflammation and presence of Lewy bodies. Although, PD has been considered to affect individuals with age above 50 years, the symptoms may manifest in people under the age of 21 years, being in this case called 'juvenile Parkinsonism. Juvenile PD occurs sporadically or as autosomal hereditary condition associated with a mutation on the gene PARK2. In this scenario, this study had as objective to analyze the contribution of the neuroinflammation in the pathophysiology of the juvenile PD in the genetic model with deletion of the PARK2 gene. For this, C57BL/6 and knockout for PARK2 mice had the neuroinflammatory state induced by intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide (LPS; 0.33 mg/kg). Four hours after the administration the animals were submitted to the behavioral tests namely, open field and social interaction. Afterwards, the animals were perfused for striatal collection to perform morphological and molecular analyzes. Our results showed that the genotype promotes cognitive impairment only in the social interaction paradigm. However, the acute administration of LPS compromised locomotor activity and reduced the number and intensity of the visits in the social interaction test. Still, the genotype and the administration of LPS modulated gene expression of important genes related to the synthesis of BH4, mitochondrial metabolism and brain plasticity.

Moreover, the treatment and genotype promoted morphological mitochondrial alterations including, reduction of the area and subcellular relocation of mitochondria. In addition, the distance of mitochondria respect to the nuclear membrane was also reduced. Altogether, this work allows us to conclude that the deletion of PARK2 in addition to the inflammatory state promotes greater susceptibility for neurogeneration, mainly due to mitochondrial adaptations and reduced BH4 pathway flow, which could contribute to the pathophysiology of juvenile PD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismos de indução de mitofagia.....	36
Figura 2.	Vias de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4).....	41
Figura 3.	Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano sobre os parâmetros comportamentais (número e intensidade) dos episódios de investigações, medidos através do teste de campo aberto e de interação social.....	57
Figura 4.	Efeito da administração do lipopolissacarídeo bacteriano sobre a expressão de genes que codificam para as proteínas pró- e anti-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-10 em estriado de animais C57Bl/6.....	58
Figura 5.	Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano sobre a expressão gênica da GTP ciclohidrolase, sepiapterina redutase, 6-piruvil-tetrahydropterina sintase em estriado de camundongos nocautes para o gene PARK2.....	60
Figura 6.	Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano sobre a expressão relativa de genes que codificam para as proteínas Tfam, Nrf1, NDUFA6, COX1 de camundongos nocaute para PARK2.....	62
Figura 7.	Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano sobre a expressão relativa do gene que codifica para a BDNF no estriado de animais nocaute para o gene PARK2.....	63
Figura 8.	Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano sobre o conteúdo, morfometria mitocondrial e localização mitocondrial em estriado de animais nocautes para o gene PARK2.....	65
Figura 9.	Via de <i>salvação</i> para a formação de BH4.....	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Etiologia genética da DP.....	32
Quadro 2.	Sequência <i>primers</i> utilizadas.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BH4: Tetrahydrobiopterina

cdNA: Ácido Desoxirribonucleico complementar

COX 1: Citocromo oxidase, subunidade I (subunidade do complexo IV)

COX2: Ciclooxygenase 2

DA: Dopamina

DH: Doença de Huntington

DP: Doença de Parkinson

ELA: Esclerose lateral amiotrófica

GTP: Guanosina trifosfato

GTPCH: Guanosina trifosfato ciclohidroxilase

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IL: Interleucina

INF- γ : Interferon- γ

LPS: Lipopolissacarídeo bacteriano

LRRK2: quinase rica em leucina de repetição 2

MPTP: 1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6-tetrahidropiridina

mRNA: RNA mensageiro

mtDNA: DNA mitocondrial

NDUFA6: NADH desidrogenase (ubiquinona) subcomplexo α 1,6
(subunidade do complexo I)

NF- κ B: Fator de transcrição kappa-B

NOS II: Óxido nítrico sintase induzível II

NRF1: Fator nuclear de respiração 1

PINK1: Fostatase e tensina induzida quinase 1

PTPS : 6-piruvil tetrahydropterina sintase

RT-PCR: Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa

SNC: Sistema nervoso central

SNCA: α -Sinucleína

SR: Sepiapterina redutase

Tfam: Fator A de transcrição mitocondrial

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
1.1.	Aumento da expectativa de vida e doenças neurodegenerativas crônicas.....	27
1.2.	Doença de Parkinson.....	28
1.3.	Fisiopatologia da doença de Parkinson.....	29
1.4.	Fatores genéticos DP.....	32
1.4.1.	PARK2	33
1.5.	Neuroinflamação.....	38
1.6.	Pterinas.....	39
1.6.1.	<u>Tetrahidrobiopterina</u>	39
1.6.1.1	Enzimas envolvidas na síntese de BH4.....	42
2.	HIPÓTESE.....	44
3.	JUSTIFICATIVA.....	45
4.	OBJETIVOS.....	46
4.1.	Objetivo geral.....	46
4.2.	Objetivos específicos.....	46
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
5.1.	Animais.....	47
5.2.	Indução do estado neuroinflamatório.....	47
5.3.	Análises Comportamental.....	48
5.3.1.	Campo Aberto.....	48
5.3.2.	Interação social.....	48
5.4.	Análise de expressão gênica.....	49
5.4.1.	Extração de RNA total.....	49

5.4.2.	Síntese de DNA complementar (cDNA).....	50
5.4.3.	Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR).....	51
5.5.	Microscopia eletrônica de transmissão.....	53
5.6	Estatística.....	55
6.	RESULTADOS.....	56
6.1.	Efeito do genótipo e da administração de LPS sobre os parâmetros comportamentais de locomoção e de interação social, em animais nocautes para o gene PARK2.....	56
6.2.	Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica de genes envolvidos no estado neuroinflamatório em estriado de animais C57Bl/6 (background genético dos animais nocaute para o gene PARK2).....	58
6.3.	Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de BH4 em estriado de animais nocautes para o gene PARK2.....	59
6.4.	Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo mitocondrial em estriado de animais nocautes para o gene PARK2.....	61
6.5.	Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em estriado de animais nocautes para o gene PARK2.....	63
6.6.	Efeito da neuroinflamação no conteúdo, morfometria mitocondrial e localização celular em estriado de animais nocaute para o gene PARK2.....	64

7.	DISCUSSÃO.....	67
8.	CONCLUSÃO.....	75
9.	PERSPECTIVAS.....	76
10.	BIBLIOGRAFIA.....	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aumento da expectativa de vida e doenças neurodegenerativas crônicas

O envelhecimento populacional, proeminente fenômeno mundial que nas últimas décadas está modificando as sociedades, tem como principal consequência o aumento na frequência das enfermidades neurodegenerativas no adulto. Dentre estas patologias, podemos destacar a doença de Parkinson (DP), a qual é considerada a segunda maior causa de morte por doença neurodegenerativa. De acordo como a Organização Mundial da Saúde (WHO), a partir da metade deste século as doenças neurodegenerativas representarão a segunda maior causa de óbito, principalmente pela falta de tratamentos eficazes que permitam prevenir, atenuar ou reverter estes processos (Lipton et al., 2007, Imtiaz et al., 2014). Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 1950 existiam cerca de 204 milhões de pessoas com mais de 60 anos de idade no mundo, sendo que dados de 2012 do Fundo de Populações das Nações Unidas, mostrou que esta população de idosos alcaçava 810 milhões, constituindo 11,5% da população mundial. Dados recentes do IBGE, estimam que em 2060 o Brasil terá 5 milhões de idosos com mais 90 anos. Esta corresponde a uma população dez vezes maior que a atual, sendo que a expectativa de vida média em 2060 chegará a 81,2 anos, sendo 78 anos para homens e 84,5 anos para as mulheres (IBGE,2013). Embora estes dados reflitam um claro avanço na qualidade de vida de parte da população, eles também alertam para a possibilidade de que em um futuro próximo haja um crescimento

significativo do número de pessoas idosas acometidas por doenças crônicas neurodegenerativas

As enfermidades neurodegenerativas crônicas podem ser definidas como um grupo de doenças heterogêneas caracterizadas por um início insidioso, de progressão lenta e com características neuropatológicas fortemente associadas à degeneração em áreas específicas cerebrais. Como exemplos, podem ser citados a degeneração dos neurônios dopaminérgicos da substância nigra parte compacta na doença de Parkinson (DP) (Jellinger, 1988, Blandini et al., 2000), dos neurônios corticais na doença de Alzheimer (DA), dos neurônios pequenos do estriado doença de Huntington (DH), ou dos neurônios motores na esclerose amiotrófica lateral (ELA) (Ross and Poirier, 2004).

1.2. Doença de Parkinson

A DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa relacionada com a idade com maior incidência mundial, ficando atrás somente da doença de Alzheimer (Vila and Przedborski, 2004). Segundo a WHO a DP é um distúrbio universal, com uma taxa de incidência de 4,5-19 indivíduos a cada 100.000 habitantes por ano. Embora, a DP tenha sido considerada tradicionalmente por afetar indivíduos de ambos os sexos, dados publicados mostram uma maior proporção de homens que são afetados pela doença (Wooten et al., 2004).

A primeira descrição da DP foi realizada por James Parkinson em 1871 no livro “*An Essay on the Shaking Palsy*” (Parkinson, 2002). A DP é definida clinicamente por sinais cardinais motores que incluem bradicinesia, rigidez, instabilidade postural, tremor de repouso (Kummer and Teixeira, 2009, Schrag et al., 2015). Outros sintomas que podem ser

encontrados em pacientes em estágio avançado da doença são a disartria, micrografia e sintomas não-motores como demência, alterações do sono e humor, depressão, fadiga e dor (Chaudhuri et al., 2006, Campos-Sousa et al., 2010), além de perda olfativa (Doty et al., 1988, Khan et al., 2005). Manifestações psiquiátricas que incluem depressão e alucinações visuais são comuns, mas não uniformemente presente. A demência ocorre em pelo menos 20% dos casos. Geralmente, os indivíduos na qual a doença se manifesta antes dos 21 anos de idade são considerados como pacientes com DP de início juvenil, aqueles com início antes dos 50 anos de idade são classificados como DP de início precoce, e aqueles com início após os 50 anos são considerados como pacientes com DP de início tardio (Pankratz et al., 1993).

Embora muito tenha sido os avanços sobre o entendimento da DP, a doença ainda é incurável, e sua etiologia ainda permanece sem ser definida, e os pacientes acometidos por essa doença apresentam expectativa de vida reduzida (Alves et al, 2008).

1.3. Fisiopatologia da doença de Parkinson

A DP apresenta como característica neuropatológica a perda de neurônios dopaminérgicos da substância nigra, parte compacta, com inclusões citoplasmáticas (corpos de Lewy). Sendo assim, tradicionalmente, a presença de corpos de Lewy foi necessária para a confirmação diagnóstica da DP. A fisiopatologia da DP está também associada à disfunção dos sistemas neurotransmissores, principalmente por uma redução nas concentrações de dopamina (DA) no corpo estriado (Burch and Sheerin, 2005). No entanto, com a descoberta de novos

subtipos da doença, como por exemplo, mutações no gene da proteína PARK2, têm sido reconhecidas que a patologia pode ocorrer, ainda com ausência de corpos de Lewy (Kitada et al., 1998). Neste contexto, a maioria dos casos de DP são esporádicos na natureza, no entanto, mutações em vários genes foram identificados como causadores de DP, de herança autossômica dominante ou recessiva (Abeliovich and Flint Beal, 2006). Os genes associados com as principais manifestações clínicas da doença incluem PARK1, o qual codifica para a proteína α -sinucleína, PARK2 para parkina, PARK6 para PINK1 (PTEN- induzida quinase 1), PARK7 para a proteína DJ-1, e PARK8 a qual codifica a proteína LRRK2 (quinase rica em leucina de repetição 2). A ativação do sistema imune também tem sido envolvido na fisiopatologia da DP. A estimulação deste sistema ativa o fator nuclear $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), fator de transcrição que promove processos inflamatórios e de estresse oxidativo. Dessa maneira, há uma estimulação para a produção de interferon- γ , a qual será responsável na ativação e recrutamento de macrófagos. Essa ativação do sistema imune pode ser monitorada através da formação da neopterina, uma pteridina derivada da GTP (Widner et al., 2002). Pacientes afetados pela DP apresentam altas concentrações dessa pteridina (Freitas et al., 2012; Dissertação de Mestrado).

Vários mecanismos patogênicos para DP já foram propostos, incluindo disfunção mitocondrial, estresse oxidativo e nitrosativo, agregação e falhas no dobramento proteico, apoptose, respostas inflamatórias e excitotoxicidade glutamatérgica exacerbadas (Tansey et al., 2007, Tsang and Chung, 2009). No entanto, nenhuma destas vias de forma independente tem demonstrado ser o mecanismo citotóxico causador exato que conduz à perda de neurônios dopaminérgicos na DP

(Ross and Poirier, 2004, Abeliovich and Flint Beal, 2006). Com a descoberta que a inibição seletiva do complexo mitocondrial I pelo MPTP (1-metil-4-fenil-1, 2, 3, 6 tetra-hidropiridina) leva ao desenvolvimento de parkinsonismo, surgiu uma forte evidência de que a disfunção mitocondrial estaria diretamente envolvida na patogênese da DP (Schapira et al., 1989). A deficiência do complexo I na PD pode também ser considerada uma alteração sistêmica da fosforilação oxidativa, uma vez que a deficiência também foi constantemente observada em plaquetas de pacientes afetados pela DP (Parker et al., 1989, Krige et al., 1992, Haas et al., 1995)

Os resultados obtidos a partir da fusão de linhagens híbridas celulares (*cybrids*), obtidos a partir da fusão de células que não possuem mtDNA com plaquetas de pacientes com DP, que apresentam inibição do complexo I com a linhagem celular Rho0, produziram *cybrids* celulares com deficiência no complexo I, sugerindo que a diminuição da atividade do complexo I seja devida a alterações no genoma mitocondrial (Swerdlow et al., 1996, Gu et al., 1998). Além disso, estas células *cybrid* estão associados com o estresse oxidativo e a formação de agregações citosólicas, ligando a disfunção mitocondrial do complexo I com a formação dos corpos de Lewy. O comprometimento na atividade do complexo I leva a uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, os quais contribuem para o acúmulo de mutações e dano oxidativo ao mtDNA devido sua maior susceptibilidade ao ataque oxidativo pelo fato de ser uma molécula circular e não empacotada como o DNA nuclear (Suen et al., 2010, Arduino et al., 2015).

1.4. Fatores genéticos da DP

A contribuição genética na fisiopatologia da DP surgiu no final do século XIX com estudo epidemiológico realizado por Gowers (1893), em que observou que 15% de seus pacientes apresentavam histórico familiar. A partir desses achados e de novos estudos o papel dos fatores genéticos na DP tem sido sujeito a uma intensa investigação. O parkinsonismo primário familiar, decorrente de defeitos genéticos específicos, tem sido encontrado em cerca de 20% dos casos diagnosticados como DP. Os principais genes associados às manifestações clínicas da doença estão citados na Tabela 1.

Quadro 1: Etiologia genética da DP, herança e tipo de parkinsonismo

PARK (locus)	Gene	Cromossomo	Herança	Tipo de Parkinsonismo
PARK1/ PARK4	SNCA	4q21	Autossômica dominante	Início precoce
PARK2	Parkin	6q25-27	Autossômica recessiva	Juvenil
PARK6	PINK1	1p35-p36	Autossômica recessiva	Início precoce
PARK7	DJ-1	1p36	Autossômica recessiva	Início precoce
PARK8	LRRK2	12q12	Autossômica dominante	Início tardio

Em torno de 20% dos casos da DP ocorrem devido a mutações genéticas, a identificação destes genes teve um impacto significativo na compreensão dos mecanismos que determinam a degeneração

dopaminérgica, pois as proteínas codificadas por eles são responsáveis pelo controle da homeostase mitocondrial.

O primeiro gene descoberto ligado a doença de Parkinson foi a α -sinucleína (SNCA), responsável pela codificação de uma proteína pré-sináptica envolvida na plasticidade neuronal e também na dinâmica de vesículas e na síntese de dopamina (Polymeropoulos et al., 1997, Farrer, 2006). Os estudos mostram que mutações neste gene resultam em níveis aumentados de protofibrilas, que são consideradas a forma mais tóxica da proteína. Além disso, a mutação em A30P da α -sinucleína potencializa a toxicidade da dopamina, aumentando a lesão mediada por radicais livres e a morte celular (Schapira, 2006). Outro importante gene é o PARK6 que codifica para proteína PINK1, a qual parece proteger os neurônios de disfunção mitocondrial e apoptose induzida por estresse, sendo esse efeito suprimido no caso de mutações (Valente et al., 2004). O gene DJ-1 codifica para uma proteína que possui evidências que sugerem seu envolvimento na resposta ao estresse oxidativo, e sua baixa expressão causa susceptibilidade ao estresse oxidativo e inibição do mecanismo proteossoma (Bonifati et al., 2003, Farrer, 2006). Ainda, outro gene citado na literatura é o gene LRRK2 o qual se acredita que exerça um papel na integração do tráfego celular e sinalização intracelular, e a mutação desse gene potencializa sua atividade quinase (Siva, 2006).

1.4.1. PARK2

As mutações no gene que codificam para a proteína parkina (PARK2) são responsáveis por quase metade de todos os casos

autossômicos recessivos da DP, especialmente aqueles com início antes dos 21 anos de idade (Healy et al., 2004). Essa proteína possui aproximadamente 52 kDa (426 aminoácidos) e é codificada pelo gene PARK2 que está localizado no cromossomo 6q (Miklya et al., 2014). O PARK2 é expresso principalmente no sistema nervoso, e a proteína codificada por esse gene é um membro da família de ubiquitina-E3 ligase, que tem como função sinalizar as proteínas que serão degradadas no proteassoma através da ubiquitinização (Huang et al., 2004). O sistema de degradação no proteassoma tem um papel fundamental em muitos processos vitais para a célula e sua disfunção está relacionada com a fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (Ciechanover and Brundin, 2003).

Estudos realizados em leveduras identificaram proteínas específicas envolvida relacionada ao mecanismo de mitofagia, como por exemplo, o gene da proteína de membrana mitocondrial externa relacionada com autofagia 32 (ATG32). Esta proteína recruta a maquinaria autofágica para as mitocôndrias disfuncionais. Em mamíferos este mecanismo requer a proteína Nix, residente na mitocôndria que se liga diretamente a proteína associada à microtúbulos de cadeia leve da proteína 3 (LC3) para a degradação de mitocôndrias de eritrócitos. Em contra partida, a via de eliminação das mitocôndrias danificadas é mediada pela via PTEN induzida quinase putativa 1 (PINK1) e a ubiquitina E3 ligase (Parkina). PINK1 e parkina acumulam-se em mitocôndrias danificadas promovendo a sua segregação da rede mitocondrial, direcionando essas organelas para a degradação autofágica em um processo que requer ubiquitinação dependente de parkina (Figura 1) (Youle and Narendra, 2011, Ashrafi and Schwarz, 2013). As

mutações autossômica recessivas nestes genes parecem ocasionar alteração do tipo “perda de função”, comprometendo a ativação da mitofagia e levando a um acúmulo de mitocôndrias disfuncionais (Healy et al., 2004). A acumulação de mitocôndrias disfuncionais no cérebro dos pacientes com DP implica uma ligação entre PINK1 e parkina no controle de qualidade mitocondrial. Estudos genéticos em *Drosophila* sugerem ainda papel para PINK1 e Parkin na regulação da integridade mitocondrial e a perda de uma dessas proteínas em *Drosophila* resulta em disfunção mitocondrial que promove a degeneração dos músculos do vôo e neurônios dopaminérgicos. (Greene et al., 2003).

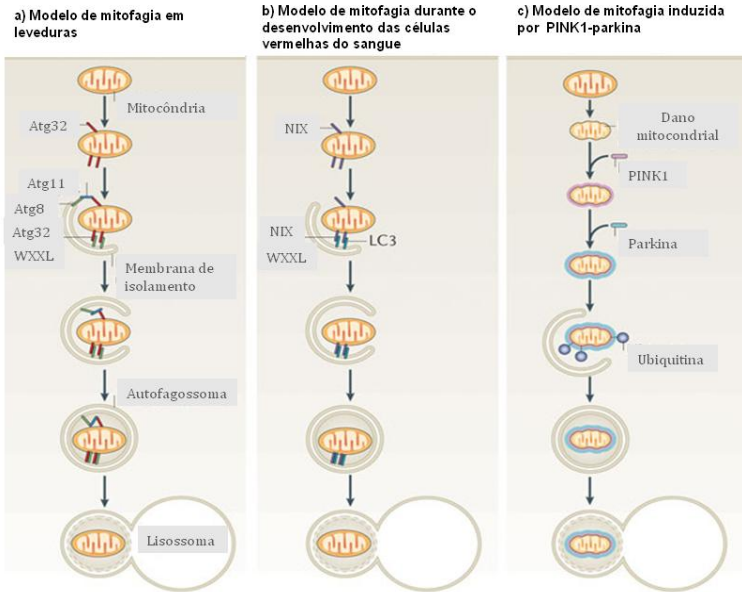


Figura 1. Mecanismos de indução de mitofagia: (A) A degradação de mitocôndrias disfuncionais acontece através da sinalização mediada pelas proteínas de membrana mitocondrial 32 (Atg32), Atg11, Atg8 e WXXL que promovem a formação e fusão do autofagossomo ao lisossomo em leveduras. (B) Na diferenciação dos glóbulos vermelhos a sinalização da mitofagia é mediada pelas proteínas da membrana mitocondrial NIP3 (NIX; também conhecida como BNIP3L) e MAPA1 3 (LC3; um homólogo de levedura Atg8). (C) A perda do potencial mitocondrial induz o acúmulo da proteína quinase putativa 1 (PINK1) que recruta do citossol a proteína parkina, uma ubiquitina-ligase E3 promovendo a formação e fusão do autofagossomo ao lisossomo. (Adaptado de Youle e Narendra, 2011).

Diferentes estudos demonstraram que as mutações genéticas em parkina que levam a perda de função apresentam um impacto negativo sobre a fisiologia e arquitetura mitocondrial por promover disfunção mitocondrial e aumento da susceptibilidade a toxinas mitocondriais, comprometendo assim a produção energética e favorecendo a morte celular (Narendra et al., 2008). No que se refere a modelos experimentais genéticos onde o PARK2 foi deletado, podemos citar os estudos realizados na espécie *Danio rerio* (zebrafish), onde a deleção do gene comprometeu a respiração mitocondrial, promoveu sinais de estresse oxidativo, declínio no potencial de membrana mitocondrial, disfunção na homeostase do cálcio e também causou anormalidades na morfologia e dinâmica mitocondrial (Corti and Brice, 2013). Postula-se que o declínio da função mitocondrial na DP pode ser resultado da perda de controle de qualidade mitocondrial (Schon and Przedborski, 2011).

Além de estar envolvida na degradação de mitocôndrias disfuncionais, a parkina, é responsável pela regulação do fator nuclear respiratório (NRF1) pela formação de um complexo com PCG1- α s, envolvido na biogênese mitocondrial (Kuroda et al., 2006). Estudos ainda mostram que a superexpressão da parkina aumenta a transcrição e a replicação do DNA mitocondrial (mtDNA) pela associação com o fator de transcrição mitocondrial A (Tfam), promovendo a transcrição mediada por Tfam. No entanto, uma ressalva importante é que a biogênese mitocondrial induzida por parkina associada a transcrição Tfam só ocorre em células em proliferação indeferenciadas. Por isso, a sua relevância para as células pós-mitóticas diferenciadas, como neurônios não é clara (Lim et al., 2012).

A apresentação clínica da DP causada pelas mutações no gene PARK2 possui algumas particularidades; início precoce dos sintomas, progressão lenta da doença com distonias, hiperreflexia e instabilidade postural precoce. Neuropatologicamente, a DP causada por mutações no PARK2 não apresenta corpos de Lewy (Lucking et al., 2000, Mizuno et al., 2001).

1.5. Neuroinflamação

A inflamação é uma das características da doença de Parkinson (DP) (Dzamko et al., 2014). Sabe-se que pacientes com DP apresentam concentrações séricas elevadas de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IL-2, IL-10, IL-6, IL-4 e INF- γ (Brodacki et al., 2008), o que indica a presença do processo neuroinflamatório. Vários estudos já demonstraram que agonistas inflamatórios tais como o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou agentes patogênicos virais induz a perda de neurônios dopaminérgicos em roedores (Qin et al., 2007).

O processo inflamatório pode ser mediado tanto por células imunes residentes, quanto por células oriundas de infiltrações de vasos sanguíneos (Witte et al., 2010). As células residentes do sistema imunológico atuam como a primeira e principal defesa imunológica ativa no sistema nervoso central (SNC), e estão representadas principalmente pela microglia. A microglia é um tipo de célula glial originada de células mielóides composta por macrófagos residentes no cérebro e medula espinhal, com predominante localização na substância cinzenta e apresentando-se em maiores concentrações no hipocampo, gânglios basais e substância nigra (Block et al., 2007). A neuroinflamação é mediada pela ativação microglial, com consequente

produção de citocinas pró-inflamatórias, as quais, podem promover a expressão da óxido nítrico sintase (NOS II) e/ou da ciclooxigenase 2 (COX-2), enzimas que produzem espécies reativas tóxicas (Hirsch and Hunot, 2009), mostrando então um envolvimento de eventos imunológicos no processo de neurodegeneração na DP.

Estudos mostram o envolvimento da parkina na regulação da produção de citocinas inflamatórias após o tratamento com LPS, onde animais deficientes em parkina tem um aumento na susceptibilidade à perda neuronal dopaminérgica induzida por LPS, e mostraram também aumento de forma dependente na produção de IL6, IL-1 β e NOSII pelos macrófagos ativados desses animais tiveram um (Frank-Cannon et al., 2008, Tran et al., 2011).

1.6. Pterinas

1.6.1. Tetrahydrobiopterina

A tetrahydrobiopterina (BH4) é um cofator obrigatório para a atividade de todas as isoformas de NOS (Mayer et al., 1990, Werner et al., 1998), assim como para as enzimas fenilalanina hidroxilase, tirosina hidroxilase e triptofano hidroxilase, as quais participam na biossíntese dos neurotransmissores dopamina e serotonina (Kaufman, 1963). É uma molécula sintetizada por três vias: A síntese *de novo*, via de salvação e via de reciclagem. Na síntese *de novo* a BH4 é sintetizada a partir da guanosina trifosfato (GTP) que é convertido a 7,8-diidroneopterina trifosfato pela catálise enzimática da GTP ciclohidrolase (GTPCH). A seguir, a 6-piruvil-tetrahydropterina sintase (PTPS) converte a 7,8-diidroneopterina trifosfato em 6-piruvil-tetrahydropterina, e finalmente

a sepiaterina redutase (SR) realiza a redução do intermediário 6-piruvoil-tetrahydropterina em BH4 (Bracher et al., 1998, Thony et al., 2000). No entanto, apesar da SR ser suficiente para completar a biossíntese de BH4, as enzimas carbonil e aldose redutases representam uma forma alternativa para a realização do último passo da via e síntese desta pterina, denominada via de salvação, onde convertem 6-piruvoil-tetrahydropterina nos intermediários 6-lactoil-tetrahydropterina ou 1'-OH-2'oxopropil-tetrahydropterina que são então isomerizados por SR formando para formar BH4 (Blau et al., 2011). Além disso, durante a hidroxilação enzimática dos aminoácidos aromáticos, o oxigênio é consumido e a BH4 é oxidada em diidrobiopterina podendo ser regenerada através da via de reciclagem que envolve as enzimas diidrofolato redutase e diidropterina redutase, respectivamente (Porkert et al., 2008). Esta via de reciclagem da BH4 acontece principalmente no fígado, devido a grande demanda de BH4 exigida para a atividade da fenilalanina hidroxilase, o que conseqüentemente acaba sendo importante para manter o conteúdo fisiológico de BH4 nos demais tecidos do organismo, em especial do cérebro, visto que BH4 permeia a barreira hematoencefálica. Ainda, BH4 controla sua própria síntese por um circuito regulador através da ação da proteína reguladora da ativação da GTPCH (GFRP) (Blau et al., 2011).

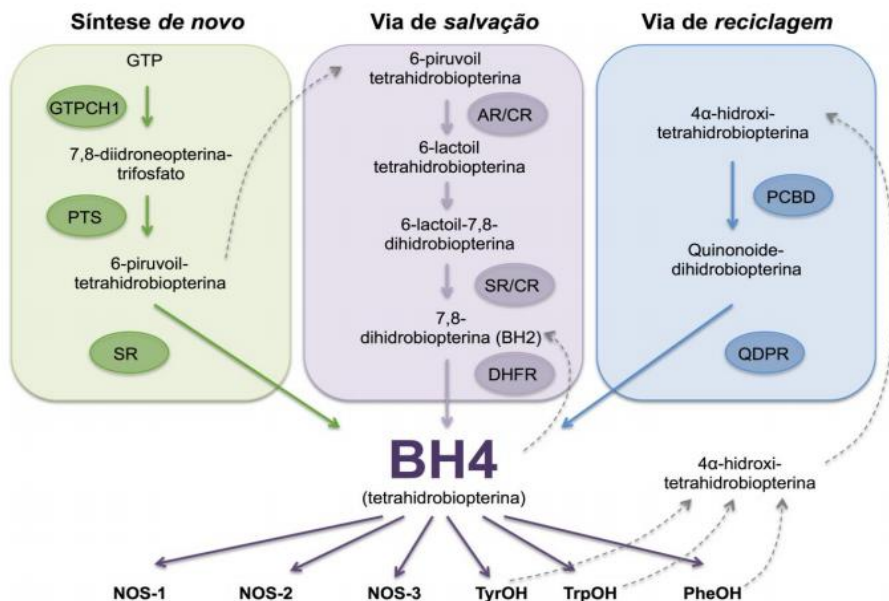


Figura 2. Vias de síntese da tetrahydrobiopterina (BH4). A BH4 pode ser sintetizada por três vias metabólicas distintas, a via de síntese de novo, a via de salvação e a via de reciclagem. GTP: guanossina trifosfato, GTPCH1: GTP ciclodrolase 1, PTS: 6-piruvil tetrahydrobiopterina sintase, SR: sepiapterina redutase, AR: aldose redutase, CR: carbonil redutase, DHFR: dihidrofolato redutase, PCBD: pterina-4 α -carbinolamina desidratase, QDPR: quinonoide-dihidrobiopterina redutase, NOS-1: óxido nítrico sintase neuronal, NOS-2: óxido nítrico sintase induzível, NOS-3: óxido nítrico sintase endotelial, TyrOH: tirosina hidroxilase, TrpOH: triptofano hidroxilase e PheOH: fenilalanina hidroxilase. Adaptado de Costigan e col. (2012).

1.6.1.1 Enzimas envolvidas na síntese de BH4

As enzimas responsáveis pela síntese de BH4, GTPCH, PTPS e SR apresentam principalmente localização nuclear em cérebro de rato (Elzaouk et al., 2004). Neurônios catecolaminérgicos e serotoninérgicos apresentam imunoreatividade positiva para estas enzimas, coincidindo o local de síntese de BH4 com o de síntese de neurotransmissores. Além disso, células de hipocampo, hipotálamo e amígdala também apresentam imunoreatividade positiva para estas enzimas, sendo sempre mais eminente a reatividade nuclear da PTPS em condições basais (Elzaouk et al., 2004). Neste sentido, tem sido demonstrado uma redução significativa da expressão da PTPS e um aumento de 400% de SR em tecido cerebelar *postmortem* de indivíduos diagnosticados neurológica e neuropatologicamente de DP, mostrando assim, um envolvimento desta via metabólica na fisiopatologia desta doença (Tobin et al., 2007).

Em condições basais a enzima do metabolismo de BH4 que controla o fluxo metabólico é a GTPCH (Viveros et al., 1981). No entanto, em condições inflamatórias, a expressão e conteúdo de GTPCH é induzida tornando-se a enzima limitante a PTPS. Os principais indutores desta desregulação metabólica são INF- γ e IL-2, dois mediadores pró-inflamatórios, já encontrados em soro de pacientes com DP, como citado anteriormente (Brodacki et al., 2008). Dessa forma, é possível propor que alterações nesta via metabólica possam estar relacionadas com a deficiência dopaminérgica característica da DP. Adicionalmente, esta situação pode ser promovida por estresse oxidativo e deficiências mitocondriais, dois mecanismos de neurotoxicidade envolvidos na DP (Mizuno et al., 1989, Schapira et al., 1990). Ainda,

tem sido evidenciado que pacientes com mutações em PARK2 apresentam redução nas concentrações de biopterina no líquido cefalorraquidiano (Furukawa et al., 1995), mostrando dessa forma um prejuízo na disponibilidade de BH4.

2. HIPÓTESE

Baseado no exposto anteriormente, formulamos a hipótese de que durante condições de neuroinflamação as concentrações de BH4 são desviadas para a manutenção da produção de NO durante o processo inflamatório, comprometendo a produção de dopamina e favorecendo portanto o desenvolvimento de DP.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando a projeção do aumento no número de indivíduos que serão acometidos por doenças neurodegenerativas, em especial pela DP, uma melhor compreensão acerca da etiologia e dos mecanismos envolvidos na sua fisiopatologia torna-se imperativa. Pacientes com DP apresenta significativa redução da qualidade de vida, devido principalmente ao desenvolvimento dos prejuízos funcionais motores e não motores e também elevado risco de morte quando comparado à população em geral. Neste contexto, a ampliação do conhecimento sobre esta doença torna-se necessário para que, desta forma, métodos mais eficazes de tratamento possam ser desenvolvidos. Assim, o presente projeto foi elaborado com o propósito de melhor entender a contribuição da neuroinflamação na fisiopatologia da DP, utilizando-se um modelo experimental de deleção do gene PARK2. Ainda, esperamos com a aquisição destes resultados, contribuir para que, futuramente, medidas preventivas mais efetivas sejam tomadas, e/ou para o desenvolvimento de meios terapêuticos mais eficazes para a prevenção e/ou tratamento das lesões neurológicas presentes nestes indivíduos, possibilitando tanto benefícios socioeconômicos como melhor qualidade de vida aos pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar a contribuição da neuroinflamação na fisiopatologia da doença de Parkinson em modelo genético por deleção do gene PARK2.

4.2. Objetivos específicos

Avaliar o comportamento doente e de locomoção espontânea em animais nocaute para o gene PARK2 (*parkina^{-/-}*), em condições de neuroinflamação, além de avaliar os seguintes parâmetros no estriado destes animais:

A) A expressão de genes envolvidos com a função mitocondrial, incluindo o fator A de transcrição mitocondrial (Tfam), as subunidades dos complexos I e IV (NDUFA6 e COX I, respectivamente) e NRF1 (fator nuclear de respiração), utilizando a técnica de RT-PCR em tempo real;

B) O conteúdo mitocondrial e a morfologia das mitocôndrias, através de microscopia eletrônica de transmissão;

C) A expressão de genes envolvidos com o estado neuroinflamatório, IL-1 β , IL-6 e IL-10, por RT-PCR em tempo real;

D) A expressão de GTPCH, PTPS e SR, genes envolvidos com a biossíntese de BH4, por RT-PCR em tempo real.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Foram empregados camundongos C57BL/6 de 10 meses de vida como background genético (WT) e animais nocaute para o gene PARK2 (KO). Para o teste de interação social foi utilizado ainda um filhote de C57BL/6 de 3 semanas de idade. Estes animais foram cedidos pela Profa. Olga Corti do *Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale* INSERM, Paris - França. Os animais foram gerados de acordo com protocolo proposto por (Itier et al., 2003), onde camundongos C57BL/6 tiveram deleção do gene que codifica para a proteína parkina, na região do *exon 3*. Os animais foram inicialmente aclimatizados ao biotério em temperatura controlada $23\pm 1^{\circ}\text{C}$, ciclo claro/escuro de 12 horas e livre acesso à água e à ração comercial. Todos os procedimentos foram executados de acordo com o “Guia de Princípios para o uso de Animais em Toxicologia” adotado pela sociedade de toxicologia em Julho de 1989.

5.2. Indução do estado neuroinflamatório

O estado neuroinflamatório foi induzido pela administração de uma única injeção de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; *Escherichia coli* LPS; 0,33 mg/kg; serotipo 0127:B8 (Henry et al., 2009) 4 horas antes das análises comportamentais. Após 4 horas da administração de LPS, parte destes animais foram eutanasiados, o cérebro dissecado e o estriado coletado para análises posteriores. Para a realização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, os animais foram perfundidos com solução salina 0,9%, e em seguida tiveram o estriado dissecado e

armazenado em solução fixadora contendo paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2%.

5.3. Análise Comportamental

Para avaliar o efeito da neuroinflamação nos parâmetros comportamentais os animais (WT e KO) foram submetidos à administração intraperitoneal de LPS na dose de 0,33mg/kg e após 4 h foram submetidos aos testes de Campo aberto e interação social.

5.3.1. Campo aberto

O campo aberto consiste em uma arena (50x50cm) (Prediger et al., 2007). Após a indução do modelo de neuroinflamação, os animais foram colocados no centro do campo aberto e tiveram sua locomoção espontânea avaliada por 10 minutos. Essa avaliação incluiu a frequência de locomoção (entrar em uma divisão com as quatro patas), de levantar (apoio somente nas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena), duração de imobilidade (ausência de atividade motora, paralisado completamente) e a latência (tempo que o animal leva para iniciar o movimento após ter sido colocado no centro da arena). Cada animal foi avaliado individualmente com limpeza do com solução de etanol 5% entre os testes. As imagens do teste foram capturadas em vídeos e analisadas pela plataforma ANY-mazeTM (Martin et al., 2013).

5.3.2. Interação social

O teste de interação social foi empregado com o intuito de analisar o efeito da neuroinflamação sobre a interação social dos animais WT e KO. A interação social é o método pelo qual os roedores se

identificam. Para realização deste experimento os animais foram inicialmente habituados à arena (50x50 cm) por dois dias consecutivos pelo período de 10 minutos cada sessão. No terceiro dia os animais dos grupos WT e KO receberam a administração de LPS (0,33 mg/kg) e foram mantidas em gaiolas separadas por 4 horas antes da realização do teste. Após este período os animais foram apresentados a um filhote C57BL/6 de 3 semanas de idade protegido por uma pequena gaiola de grade circular (7x7cm) colocada no centro da arena. A análise de interação social foi avaliada pela quantidade e pelo tempo de interação do animal adulto com o filhote (visitas) durante 5 minutos. O experimento foi registrado em vídeo e posteriormente analisado na plataforma ANY-mazeTM (Martin et al., 2013).

5.4. Análise de expressão gênica

5.4.1. Extração de RNA total

O isolamento do RNA total foi realizado a partir de amostras de estriado de camundongos WT e KO pelo método TRIzol®/clorofórmio/isopropanol de acordo com as especificações do fabricante. Após homogeneização das estruturas com 200 µL do reagente TRIzol[®] foi realizado a separação da fase aquosa pela adição de 0,2 mL de clorofórmio por centrifugação (10.000 \times g) por 15 minutos a 4°C. Após o término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) sendo desprezada a fase que continha o TRIzol[®]/clorofórmio. A precipitação do RNA total foi realizada com adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto na fase aquosa coletada. As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e uma

nova centrifugação foi realizada ($10.000 \times g$ por 10 minutos a 4°C). Em seguida, o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75% em água *DEPC*, seguido por centrifugação ($5.000 \times g$ por 5 minutos a 4°C) e posteriormente resuspendido em $20 \mu\text{L}$ de água *DEPC* e armazenados a -80°C . A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotômetro, NanoDrop, a 260nm e 280nm .

5.4.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir da transcrição reversa de $1\mu\text{g}$ de RNA, utilizando o kit “M-MLV Reverse Transcriptase” (Sigma) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. O cDNA foi gerado em uma reação com volume final de $20 \mu\text{L}$ contendo tampão M-MLV transcriptase reversa, $0,1 \text{ M DTT}$, 20 U RNase OUT , $0,25 \mu\text{g/ml}$ Randon primer, 10mM dNTP e 400U de M-MLV transcriptase reversa. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 15 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias. A seguir a reação de síntese de cDNA foi realizada com uma primeira incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, seguida de uma incubação a 37°C por 50 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C . A eficiência de síntese e a qualidade do cDNA foram verificadas através do aparelho NanoDrop a 260nm e 280nm .

5.4.3. Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR)

Foram estudados genes envolvidos na síntese de BH4 (GTPCH, SR e PTPS), no metabolismo energético mitocondrial (proteínas mitocondriais dos complexos I e IV, Tfam, Nrf1) e no estado inflamatório (IL-1 β , IL-6 e IL-10). Como controle interno da amplificação por PCR foi empregado β -actina. As reações foram realizadas em triplicata. Os iniciadores (*primers*) utilizados foram desenhados utilizando o programa “BLAST” disponível em: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, de acordo com os exons específicos para cada proteína (Quadro 2).

Quadro 2. Sequência de *primers* utilizada.

Gene	β-actina
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5'GGAGATGGCCACTGCCGCAT 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5'ACGCAGCTCAGTAACAGTCCGCCTA3'
Gene	GTP- ciclodrolase I (GTPCH)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' TGAGCCCCAGTCCGGGTGAC 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' GTGCTAACAAAGCGCTGCGGC 3'
Gene	Seapterina Reductase (SR)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' CCGAGTGTGCGGGTGTCTGAG 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' CCAGCGCCCCATCCGACTTC 3'
Gene	6-piruvil-tetrahidropterina sintase (PTPS)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' GTCCTTCAGCGGAGCCACC 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' CCCGTGTGAGGCCCTGGTGT 3'
Gene	Interleucina 10 (IL-10)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' ATCATTTCGATAAGGCTTGG 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' TGCTATGCTGCCTGCTCTTA 3'
Gene	Interleucina 1β (IL-β)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' TCATTGTGGCTGTGGAGAAG 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' AGGCCACAGTATTTTGTGC 3'
Gene	Fator respiratório nuclear 1 (Nrf1)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' GGGCTGCAGTCAGGACTTCTCC 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' TCACTTCTCCGGTCTTTGG 3'
Gene	Fator de transcrição mitocondrial A (Tfam)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' GTGAGACGAACCGGACGGCG 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' AGACGAGGGGATGCGACCCC 3'
Gene	Complexo I (NDUFA6)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' GCGAGTTCTACCGCGCTTGG 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' ACCGCATAACGTGTGNTCCGC 3'
Gene	Complexo IV (COXI)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' CTACCAGTGCTAGCCGCAGGAA 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' CCCCTCCTCCAGCGGGATCAAA 3'
Gene	Fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF)
Sequência iniciadora (<i>Forward</i>)	5' TGCAGGGGCATAGACAAAAG 3'
Sequência iniciadora (<i>Reverse</i>)	5' TGAATCGCCAGCCAATTCTC 3'

Nos sistemas com volume final de 15 μL foram adicionados 1 μL do cDNA sintetizado, 7,5 μL de SYBR Green Master Mix Applied Science), 1 μL dos iniciadores específicos (*Primers*) e q.s.q. de água DEPC. As reações foram realizadas no equipamento ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems), localizado no Laboratório Multiusuário de Estudo em Biologia (LAMEB), UFSC. As condições das reações realizadas foram: 50°C por 2 minutos, desnaturação do cDNA, seguido de 40 ciclos de 95°C por 10 segundos e 60°C por 1 minuto. As análises das curvas de *melting* foram realizadas em rampa de aquecimento de 65°C a 95°C com 25 aquisições por grau. Os resultados foram analisados utilizando o software Sequence Detection Systems (SDS) versão 2.4. Para o cálculo da quantidade relativa das transcrições nas amostras estudadas, utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Neste método, a média do Ct do gene de interesse é subtraída pela média do Ct do controle interno (β -actina), resultando em um ΔCt . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de ΔCt obtido na fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os números finais obtidos são apresentados como razão entre a expressão do gene de interesse em relação ao gene de controle interno. Os resultados foram expressos como média \pm SEM de 3 animais independentes realizados em triplicata.

5.5. Microscopia eletrônica de transmissão

Após o término do período de indução da neuroinflamação de 4 horas e da realização dos testes comportamentais, os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (400mg/kg, i.p) e imediatamente perfundidos com heparina em solução salina fisiológica (NaCl 0,9%) e

em seguida perfundidos com paraformaldeído a 4%. Em seguida o estriado foi removido e pós-fixados em uma solução de paraformaldeído a 4% e glutaraldeído a 2% em tampão cacodilato 0,1M. Após o término da fixação, as amostras de tecido foram submetidas a cinco lavagens consecutivas de 5 minutos cada em tampão fosfato e em seguida foram incubadas em tampão fosfato contendo tetróxido de ósmio 1% por 30 minutos, e novamente lavadas em tampão fosfato. Após as lavagens as amostras foram submetidas a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (25; 50; 75 por 10 minutos cada) finalizando com duas lavagens em álcool etílico por 20 minutos nas concentrações de 95 e 100%. Para a impregnação da resina araldita as amostras foram submersas em uma solução de acetona e resina nas concentrações de 2:1; 1:1; 1:2; durante 30 minutos e logo em seguida imersa em araldita pura por 12 horas a 4°C. Após esse período, o tecido foi removido da resina e transferido para tubos contendo resina pura nova e então polimerizado a 60°C durante 48 horas. As amostras foram armazenadas a temperatura ambiente até a data da microtomia, a qual foi realizada em ultramicrotomo na espessura de 60 - 70 nm. As análises foram realizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEM-101 (Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC) e para as fotografias foi utilizado o sistema de captura de imagens Gatan Digital Micrograph. Foram capturadas sessenta micrografias de cada amostra na magnificação de 20.000 X. Para a mensuração da quantidade, área mitocondrial e distância destas ao respeito do núcleo, tendo como parâmetro limitante a membrana nuclear foi utilizado o software ImageJ®. O número total de mitocôndrias foi determinado pela média total de mitocôndria encontradas nas sessenta micrografias.

5.6 Análise estatística

Os resultados foram descritos como média \pm erro padrão da média (SEM). Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste *post-hoc* de Tukey e teste não paramétrico, test-*t* de Student quando *P* foi considerado significativo. Apenas valores significativos de *F* são citados no texto. Diferenças entre os grupos foram considerados significativas quando $P \leq 0,05$. O tratamento estatístico foi realizado através da plataforma STATISTICA (versão 7.0, Stat Soft, Inc.). Os gráficos foram construídos na plataforma Graph Pad Prism (versão 5.03, Graph Pad Software, Inc.).

6. RESULTADOS

6.1. Efeito do genótipo e da administração de LPS sobre os parâmetros comportamentais de locomoção e de interação social em animais nocautes para o gene PARK2

A Figura 3 mostra o efeito da administração de LPS sobre o comportamento em animais nocaute para o gene da PARK2. Pode ser observado na Figura 3B redução significativa da locomoção espontânea nos diferentes grupos experimentais após a administração de LPS, medida através da distância percorrida [$F_{(1,27)} = 40,26$; $P < 0,05$]. Deve ser ressaltado que esta medida quando mensurada antes da administração de LPS não apresentou diferenças significativas entre os grupos (Figura 3A).

A partir dos resultados obtidos pelo teste de interação social podemos observar que os animais nocautes para PARK2 apresentam redução significativa tanto na quantidade (Figura 3C) como também na duração de cada visita das investigações ao animal juvenil (intensidade) [$F_{(1,26)} = 19,81$; $P < 0,05$] (Figura 3D). Adicionalmente os resultados obtidos após a indução da neuroinflamação revelaram que a administração de LPS reduziu significativamente o número de investigações para ambos os grupos tratados com LPS [$F_{(1,27)} = 6,54$; $P < 0,05$] (Figura 3C). Nossos resultados sugerem que os animais nocautes para o gene da parkina são mais susceptíveis ao desenvolvimento do comportamento doentio associado à resposta inflamatória, comprovado pela redução significativa da intensidade e do número de investigações (Figuras 3C e 3D).

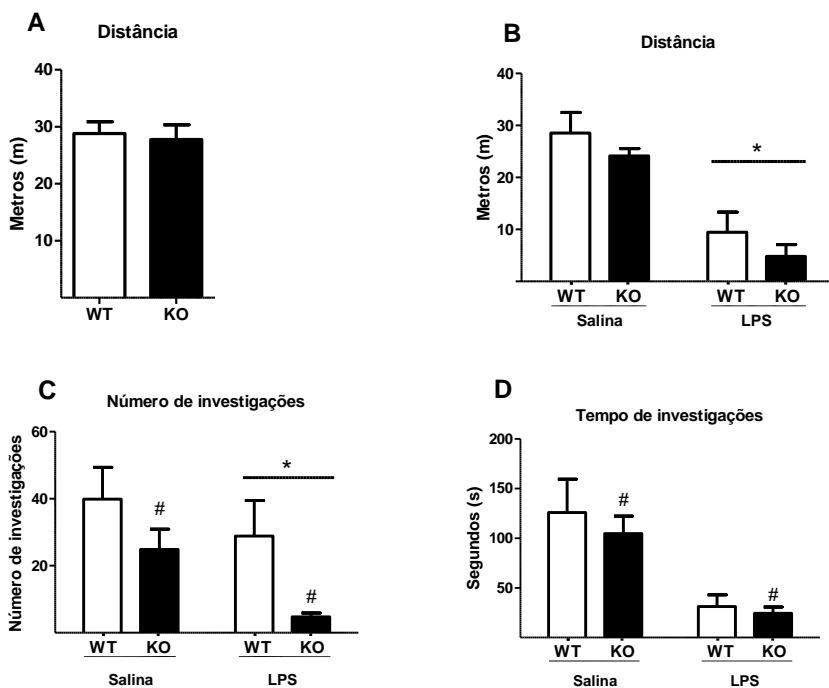


Figura 3. Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33 mg/kg) sobre os parâmetros comportamentais (número e intensidade) dos episódios de investigações, medidos através do teste de campo aberto (**A** e **B**) e de interação social, respectivamente (**C** e **D**) em animais nocautes para o gene PARK2 (KO). As mensurações das atividades comportamentais foram realizadas 4 horas após a administração de LPS. Os dados representam média \pm SEM * $P < 0,05$, vs. salina, # $P < 0,05$ vs. WT (ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc* Tukey).

6.2. Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica de genes envolvidos no estado neuroinflamatório em estriado de animais WT

A Figura 4 mostra o efeito da administração do LPS em animais C57Bl/6, na expressão de genes que codificam para as citocinas pró- e anti-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-10. Pode ser observado na figura um aumento significativo da expressão dos genes IL-1 β e IL-6 4 horas após a administração de LPS. Adicionalmente o tratamento não alterou a expressão do gene que codifica para a citocina IL-10.

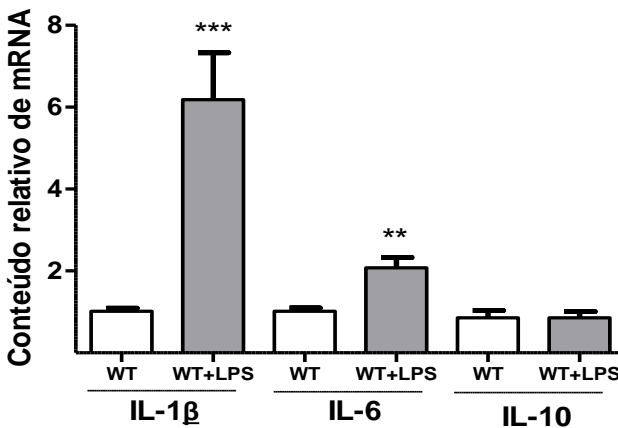


Figura 4. Efeito da administração do lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33mg/kg) sobre a expressão de genes que codificam para as proteínas pró- e anti-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-10 em estriado de animais C57Bl/6. Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para a β -actina. As barras indicam média \pm SEM de 3 animais independentes. *** $P < 0,0001$, ** $P < 0,001$ (Teste da t de Student).

6.3 Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica das enzimas envolvidas na síntese de BH4 em estriado de animais nocautes para o gene PARK2

A Figura 5 mostra o efeito da administração do LPS sobre a expressão dos genes que codificam para as enzimas GTPCH, PTPS e SR em estriado de animais nocaute para o gene da PARK2. Pode ser observado, que tanto o genótipo quanto a administração de LPS promoveu um aumento significativo no conteúdo de mRNA de SR [$F_{(1,9)}=8,48$; $P<0,05$, para efeito do genótipo; $F_{(1,9)}= 30,38$; $P<0,05$ para efeito LPS] (Figura 5B). Não foi observado diferenças significativas para as enzimas GTPCH e PTPS (Figura 5A e 5C).

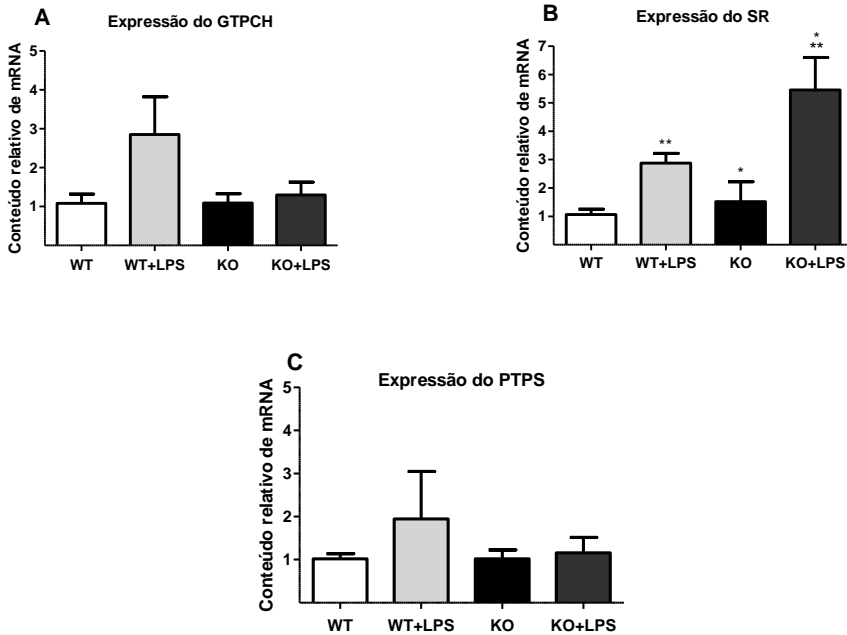


Figura 5. Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33mg/kg) sobre a expressão gênica da GTP ciclohidrolase, sepiapterina redutase, 6-piruvil-tetrahydropterina sintase em estriado de camundongos nocautes para o gene PARK2. Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para a β -actina. As barras indicam média \pm SEM de 3 animais independentes. * $P < 0,05$ para efeito genótipo; ** $P < 0,05$ para efeito LPS (ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc* Tukey).

6.4. Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo mitocondrial em estriado de animais nocautes para o gene PARK2

A Figura 6 mostra o efeito da administração de LPS sobre a expressão dos genes que codificam para as proteínas Tfam, Nrf1, NDUFA6 e COX1 relacionados ao metabolismo e função mitocondrial. Pode ser observado na Figura 6A uma redução significativa do conteúdo de mRNA do Tfam após a administração do LPS [$F_{(1,10)}=15,32$ para efeito LPS]. Também foi observado redução significativa para Nrf1, nos grupos WT+LPS, KO e KO+LPS [$F_{(1,10)}=9,98$; $P<0.05$ para o efeito do genótipo] [$F_{(1,10)}=32,79$; $P<0.05$ para o efeito do LPS] (Figura 6B). Na Figura 6C, pode ser observado uma redução significativa na expressão do gene COX1, após a administração do LPS somente no grupo WT [$F_{(1,10)}=15,32$; $P<0,05$], não sendo observado diferenças significativas para a expressão do gene NDUFA6 (Figura 6D).

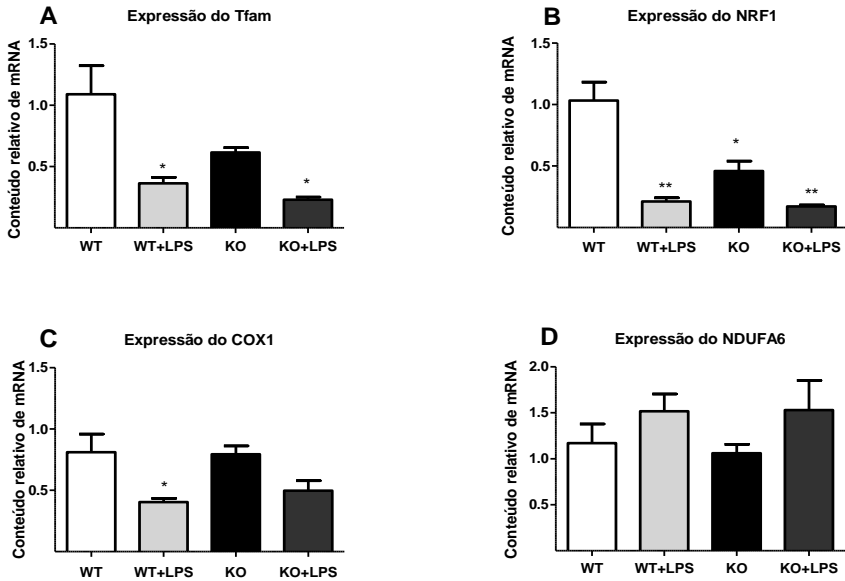


Figura 6. Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33mg/kg) sobre a expressão relativa de genes que codificam para as proteínas Tfam (A), Nrf1(B), NDUFA6 (C), COX1 (D) no estriado de animais nocaute para o gene PARK2 (KO). Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para a β -actina. As barras indicam média \pm SEM de 3 animais independentes. * $P < 0,05$ para efeito do genótipo. ** $P < 0,05$ para efeito LPS (ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc de Tukey*).

6.5. Efeito da neuroinflamação sobre a expressão gênica do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) em estriado de animais nocautes para o gene PARK2

A Figura 7 mostra o efeito da administração do LPS na expressão do gene que codifica para a proteína BDNF. Pode ser observado na figura que o genótipo promoveu redução significativa do conteúdo de mRNA de BDNF [$F_{(1,6)}=15,25$; $P<0.05$ para efeito do genótipo]. Adicionalmente a administração de LPS promoveu aumento significativo da expressão de BDNF no grupo WT e redução para o grupo KO [$F_{(1,6)}=15,25$; $P<0.05$].

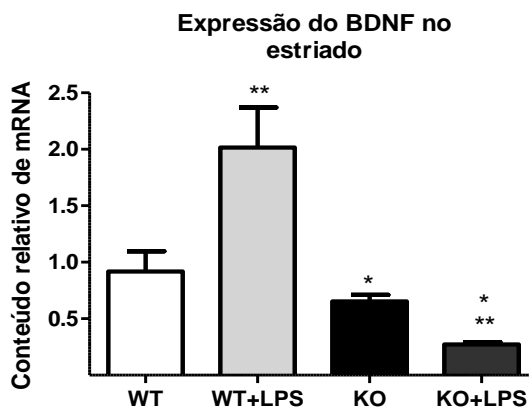


Figura 7. Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33mg/kg) sobre a expressão relativa do gene que codifica para a BDNF no estriado de camundongos nocaute para o gene PARK2 (KO). Os resultados foram normalizados mediante a quantificação da expressão do gene que codifica para a β -actina. As barras indicam media \pm SEM de 3 animais independentes. * $P < 0,05$

para o efeito parkina; $**P < 0,05$ para o efeito LPS. (ANOVA de duas vias seguido de teste *post hoc de Tukey*).

6.6. Efeito da neuroinflamação no conteúdo, morfometria mitocondrial e localização celular em estriado de animais nocaute para o gene PARK2

A Figura 8 mostra o efeito da administração de LPS sobre a morfologia, conteúdo e localização subcelular mitocondrial no estriado de animais nocaute para o gene PARK2. Pode ser observado na Figura 8G um aumento significativo na média de mitocôndrias encontradas após analisar sessenta microfotografias de cada amostra experimental [$F_{(1,8)}=257,7$; $P<0.05$ para efeito genótipo]; [$F_{(1,8)}=122,8$; $P<0.05$ para efeito LPS] sendo observado também aumento significativo do número de mitocôndrias por micrografia (Figura 8I). Em relação à área mitocondrial, observamos diferença significativa apenas do grupo KO quando comparado ao grupo WT+LPS [$F_{1,8}=22,63$; $P<0.05$ para efeito genótipo], [$F_{=1,8}=13,81$; $P<0.05$ para efeito LPS] (Figura 8F). Ainda mensuramos a distância entre as mitocôndrias e núcleo, foi possível observar nos grupos KO e KO+LPS uma significativa realocização subcelular na distância das mitocôndrias em relação a membrana nuclear [$F_{1,7}=21,47$; $P<0.05$ para efeito do genótipo] na distância das mitocôndrias em relação a membrana nuclear (Figura 8H).

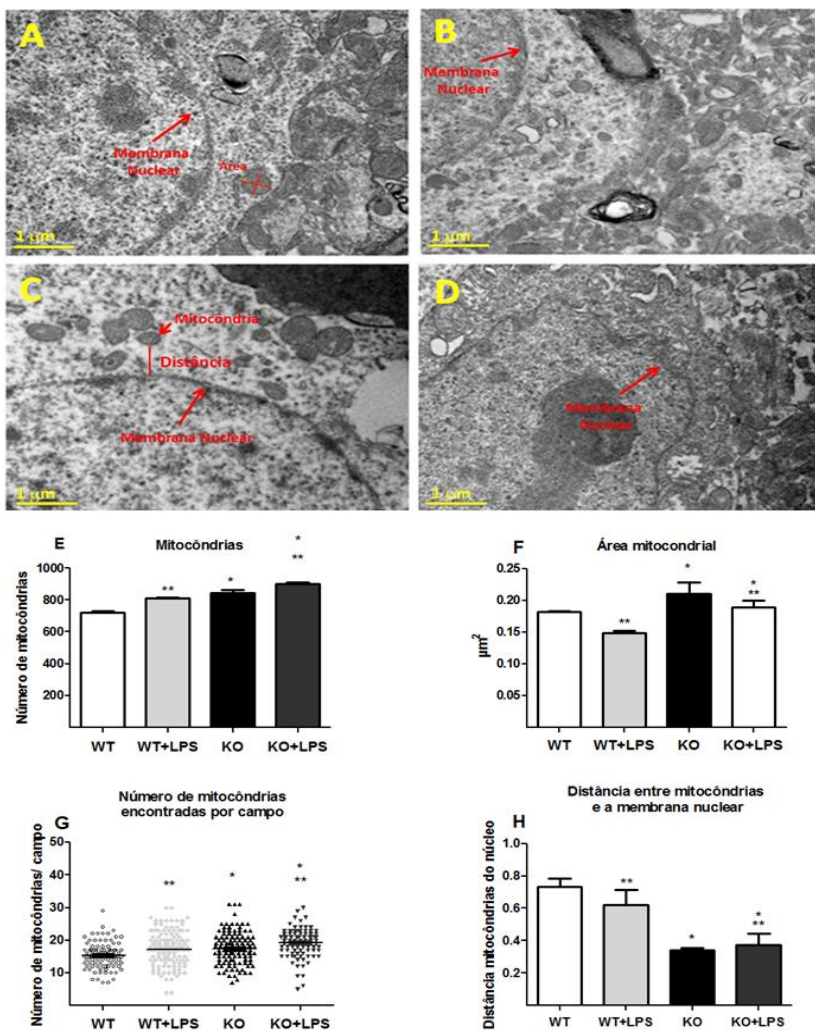


Figura 8. Efeito do genótipo e da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; 0,33mg/kg) sobre o conteúdo, morfometria mitocondrial e localização mitocondrial em estriado de animais nocautes

para o gene PARK2 (KO). As imagens A-D representam a análise ultraestrutural realizada por microscopia eletrônica de transmissão, com a magnificação de 20.000x. Para a mensuração da área mitocondrial, utilizamos o software ImageJ®. As barras indicam média \pm SEM de 3 animais independentes. * $P < 0,05$ vs. para efeito genótipo; ** $P < 0,05$ vs para efeito LPS; ANOVA de duas vias seguido de test *post hoc de Tukey*).

7. DISCUSSÃO

Com o aumento da expectativa de vida nas últimas décadas, a sociedade vem se moldando conforme as necessidades, e acompanhando esse fenômeno que resulta em uma maior média de idade populacional, nota-se o aumento proporcional de doenças neurodegenerativas. As doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, doença de Huntington e a esclerose amiotrófica lateral, são caracterizadas pela perda progressiva de células neurais em regiões específicas cerebrais. A DP é uma das doenças neurodegenerativas mais comuns na população, sendo a segunda doença neurológica mais frequente na população idosa. É caracterizada clinicamente por tremor de repouso, bradicinesia, rigidez, instabilidade postural e patologicamente por perda de neurônios da substância nigra e presença de depósito proteico intracitoplasmático (corpos de Lewy) (Wright Willis et al., 2010). Em casos raros os sintomas podem aparecer em pessoas com idade inferior aos 20 anos, sendo esta condição chamada de parkinsonismo juvenil. O parkinsonismo juvenil ocorre esporadicamente ou como afecção hereditária autossômica e tem sido associada, dentre outros, a uma mutação no gene PARK2 que codifica para uma proteína parkina. A parkina faz parte da família ubiquitina E3-ligase, que permite a remoção e degradação de proteínas intracelulares oxidadas (Hwang et al., 2014) e ainda desempenha papel essencial na manutenção da qualidade mitocondrial (Damiano et al., 2014).

Estudos realizados em modelos animais mostram que somente a perda de função de parkina não é suficiente para promover degeneração espontânea da via nigroestriatal, sugerindo que somente o fator genético não é suficiente para causar a perda de neurônios observada na DP,

sendo necessário um gatilho ambiental para que a degeneração ocorra (Frank-Cannon et al., 2008). Neste sentido, existem fortes evidências de que o processo inflamatório pode modular o risco de DP e que o processo inflamatório crônico parece fazer parte de uma cascata de eventos que leva à morte neuronal. A confirmação de neuroinflamação em cérebros de pacientes *pós-mortem* apoiam a possibilidade dos mediadores inflamatórios contribuírem para a progressão da doença (McGeer et al., 1988, Banati et al., 1998, Hunot et al., 1999, Cassarino et al., 2000, Whitton, 2007). Porém, o atual conhecimento da fisiopatologia do parkinsonismo juvenil e dos mecanismos moleculares ativados pela resposta inflamatória no SNC representa uma barreira limitante para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes.

Assim, para melhor compreender o envolvimento da resposta inflamatória na fisiopatologia do parkinsonismo juvenil utilizamos neste trabalho um modelo genético de DP gerado pela deleção do gene *PARK2* e indução de neuroinflamação pela administração intraperitoneal do LPS na dose de 0,33mg/kg (Henry et al., 2009) em animais C57Bl/6 e nocautes para o gene que codifica para parkina. Para a análise comportamental foram avaliados a locomoção espontânea pelo teste de campo aberto e a memória social pelo teste de interação social. Neste sentido, a memória social, ou paradigma de reconhecimento é gerada principalmente pela capacidade discriminativa olfatória dos animais e pode ser facilitada por drogas que aumentem a memória e interrompida em modelos farmacológicos e patofisiológicos conhecidos por causarem prejuízo da memória em roedores (Dantzer et al., 1987).

Os resultados obtidos para o teste de campo aberto demonstraram que o genótipo não compromete a atividade locomotora, corroborando com resultados prévios obtidos por Rial e colaboradores (2011). No entanto a administração do LPS comprometeu a atividade locomotora comprovada pela redução da distância percorrida independente do genótipo. Adicionalmente, a redução da locomoção espontânea observou que os animais nocaute para PARK2 apresentaram comprometimento cognitivo comprovado pela observação do prejuízo nos parâmetros de interação social (interação com o animal jovem) quando comparados ao WT, sendo esse prejuízo potencializado com a administração do LPS. A redução da locomoção espontânea e o comprometimento cognitivo observado neste estudo devem-se provavelmente ao comportamento tipo depressivo desenvolvido pelos animais em resposta a neuroinflamação (Slavich and Irwin, 2014). Estudos demonstram que a neuroinflamação induzida pela administração de LPS em baixas doses, mas de forma repetida durante três meses promove importantes alterações locomotoras e uma maior vulnerabilidade à degeneração de neurônios dopaminérgicos (Frank-Cannon et al., 2008).

Nossos resultados revelaram aumento na expressão de genes pró-inflamatórios (IL1 β , IL6) em estriado de animais C57Bl/6 após a administração de LPS, comprovando assim o estado de neuroinflamação. Envolvido no processo inflamatório no SNC, destaca-se a linhagem mieloide denominada microglia, que se encontra essencialmente vinculada à ativação da resposta imune (Gomez Perdiguero et al., 2013). Essas células são ativadas em resposta a estímulos ou toxinas, incluindo LPS (Kreutzberg, 1996). Cabe ressaltar,

que a ativação excessiva da microglia conduz à secreção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e mediadores, tais como NO, EROs, NOSII, COX-2, TNF- α , IL-1 β , e IL-6 (Jeong et al., 2014).

Outro importante fator envolvido na fisiopatologia da DP é o comprometimento mitocondrial, como por exemplo a redução da atividade do complexo I. Ainda, já foi relatado que animais com ausência de parkina, pode apresentar deficiência nos complexos I e IV, e, além disso, a deleção do gene pode levar ao acúmulo de substratos neurotóxicos, resultando em eventos de iniciação que induzam alterações na estrutura mitocondrial (Palacino et al., 2004, van der Merwe et al., 2014). Neste sentido, para entender melhor a influência da parkina e da neuroinflamação na morfologia e arquitetura mitocondrial, analisamos através da MET o efeito da administração do LPS no estriado dos animais WT e KO. Inicialmente nossos resultados demonstram que os animais KO possuem um maior número de mitocôndrias em relação ao WT e que a administração do LPS fez com que esse número aumentasse em ambos os grupos. Adicionalmente, nossos resultados revelam redução da área mitocondrial após a administração do LPS. Assim, o aumento do número e a diminuição da área mitocondrial observado após a administração do LPS é indicativo de que a fissão mitocondrial está favorecida (Westrate et al., 2014). As células possuem mecanismos que garantem o controle da qualidade e integridade mitocondrial. Além do processo de mitofagia responsável pela destruição das mitocôndrias disfuncionais, a fissão mitocondrial também pode contribuir neste controle em situações de necessidade energética ou estresse celular (Ni et al., 2014, Westrate et al., 2014). O fato das mitocôndrias estarem em maior número no grupo KO pode ser

explicado pelo fato do mecanismo da mitofagia estar prejudicado nestes animais devido à ausência da proteína parkina. Além das alterações morfológicas observadas também observamos que as mitocôndrias dos animais KO se concentravam região perinuclear, sendo ainda mais evidente esta redistribuição subcelular após a administração de LPS. Essa redistribuição subcelular mitocondrial para a região perinuclear pode ser uma resposta adaptativa da célula para suprir as necessidades energéticas locais. Nestes animais em especial tanto a biogênese como o controle da qualidade mitocondrial é comprometida devido a ausência de parkina (Damiano et al., 2014). Assim as mitocôndrias estariam se concentrando na região perinuclear para suprir a alta demanda energética nuclear para os processos de expressão gênica.

Alterações na função mitocondrial já foram relacionadas com diferentes doenças neurodegenerativas. Vários trabalhos mostram redução da atividade do complexo I em diferentes tecidos de pacientes portadores de DP e ainda essa baixa atividade do complexo I observada em pacientes de DP tem sido relacionada com mutações no gene PARK2 (Muftuoglu et al., 2004, Mortiboys et al., 2008, Grunewald et al., 2010). Resultados semelhantes de baixa atividade do complexo I foram observados em modelo de deleção do gene PARK2 em peixe-zebra (Macmillan-Crow and Cruthirds, 2001). Entretanto nossos resultados indicam que a ausência de parkina não compromete a expressão gênica de NDUFA6 (complexo I) e COX1 (complexo IV), sendo alterado apenas pela administração de LPS. Nossos resultados para expressão de NDUFA6 (complexo I) corroboram com os resultados demonstrados por Damiano e colaboradores, onde mostram que os animais nocaute para o gene PARK2 não apresentaram diferenças

significativas na atividade dos complexos respiratórios mitocondriais quando avaliados em sobrenadante pós-nucleares (Damiano et al., 2014). A redução da expressão de COX1 em WT, após a administração de LPS pode ser explicada devido à redução da expressão de NRF1 e Tfam pela administração de LPS. NRF1 é um fator de transcrição intermediário que estimula a síntese de Tfam e ainda, ativa a transcrição de genes nucleares que codificam para proteínas da cadeia respiratória. O Tfam além de estar relacionado com a expressão de proteínas da cadeia respiratória, também está envolvido na regulação da biogênese mitocondrial (Evans and Scarpulla, 1989, Chau et al., 1992, Kelly and Scarpulla, 2004, Wang et al., 2014).

Sabe-se que a DP além da presença de degeneração dos neurônios dopaminérgicos; apresenta outras alterações incluindo uma redução na produção de neurotrofinas como por exemplo o BDNF (Akatsu et al., 2006, Duan et al., 2013). O BDNF é uma proteína chave na plasticidade celular cerebral, sendo particularmente importante para a sobrevivência neuronal e relevante no desenvolvimento, além da eficiência sináptica (van der Kolk et al., 2014). Os resultados deste trabalho mostram redução significativa no conteúdo de mRNA de BDNF para os animais do grupo KO. Ainda estudos mostram que a expressão de BDNF pode ser aumentada em situações de citotoxicidade aguda induzida por LPS como mecanismo compensatório para a manutenção da homeostase celular, refletindo um mecanismo de reparo compensatório pela ativação do sistema imune e microglial (Miwa et al., 1997, Duan et al., 2013). Nossos resultados mostram que a administração de LPS promove aumento da expressão de BDNF nos animais WT. Entretanto nos animais KO a administração de LPS

potencializa a redução da expressão de BDNF observada em animais KO que não receberam LPS.

A tetrahydrobiopterina (BH4) é um cofactor essencial para a síntese de dopamina e serotonina, no entanto a BH4 exerce toxicidade em linhas de células produtoras de dopamina (Foxton et al., 2007). Nos últimos anos a BH4, vem sendo relacionada com processos neurodegenerativos observados em algumas doenças crônicas e agudas (Foxton, Land e Heales, 2007) e vários estudos têm sido sugerido como uma molécula endógena candidata ao envolvimento na patogênese da DP (Kim et al., 2003; Kim et al., 2004; Choi et al., 2006). Curiosamente, a BH4 pode exercer toxicidade especialmente em células dopaminérgicas de forma aguda quando presente em altas concentrações (Foxton et al., 2007). Neste sentido, nossos resultados mostram que tanto o genótipo quanto a administração de LPS promovem aumento na expressão de SR, ficando de acordo com estudo realizado por Tobin e colaboradores (2007). Ainda a expressão da GTPCH teve uma tendência a um aumento, porem não significativo. Esse aumento da expressão de GTPCH e SR sugerem que a via de síntese *de novo* esteja estimulada, com o intuito de aumentar as concentrações de BH4. Os nossos resultados mostram que os animais KO, após a administração de LPS obtiveram uma maior expressão da SR sugerindo que além da via de síntese *de novo*, a via de salvação também esteja ativa. Nesta ultima, a 6-piruvoil tetrahydrobiopterina pode ser transformada por um grupo de enzimas inespecíficas denominadas de aldoses / carbonil redutases ou pela própria sepiapterina redutase, em intermediários instáveis que favorecem a formação direta de BH4 ou a formação não enzimática de sepiapterina e desta em BH2 que será convertida em BH4 pela DHFR

(Figura 9) (Blau et al., 2001). A ativação dessas duas vias pode ocorrer devido à necessidade de maior produção de BH4 para a produção de NO em resposta ao processo inflamatório, pois estudo mostra que em estados inflamatórios os níveis de BH4 se encontram aumentados (McNeill and Channon, 2012). Assim o estado inflamatório associado à redução da biodisponibilidade de BH4, pelo desvio para a produção de NO durante o processo inflamatório pode comprometer a síntese de dopamina.

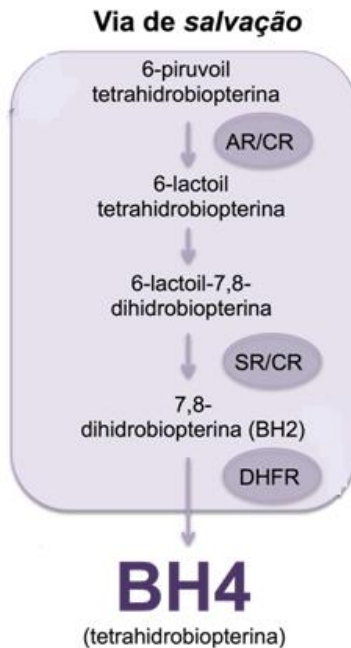


Figura 9. Via de *salvação* para a formação de BH4, (SR: sepiapterina redutase, AR: aldose redutase, CR: carbonil redutase, DHFR: dihidrofolato redutase).

8. CONCLUSÕES

- O genótipo não interfere na locomoção espontânea dos animais e a neuroinflamação induzida por LPS comprometeu este parâmetro independente do genótipo;
- Os animais KO são mais sensíveis a resposta inflamatória, visto que apresentaram comprometimento cognitivo sendo este potencializado pelo LPS;
- Nas análises morfológicas podemos concluir que o genótipo favorece a fissão mitocondrial, enquanto que a neuroinflamação promove a fissão mitocondrial em ambos os grupos;
- Verifica-se ainda uma realocização subcelular mitocondrial perinuclear dependente do genótipo, indicando uma possível resposta adaptativa para suprir as necessidades energéticas locais;
- O genótipo compromete o mecanismo compensatório de manutenção da homeostase celular promovida pela expressão de BDNF;
- A investigação da expressão gênica das enzimas relacionadas na via de síntese de BH4 indicou que o genótipo favorece uma maior ativação da via de salvação pelo aumento da expressão da SR como mecanismo compensatório em resposta a neuroinflamação;
- A análise conjunta dos resultados nos permite concluir que o nocaute do gene PARK2 promove importantes alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas as quais devem ser mais aprofundados para a maior elucidação do impacto da neuroinflamação na fisiopatologia do Parkinsonismo juvenil.

9. PERSPECTIVAS

- Aprofundar os estudos do metabolismo mitocondrial através da determinação da atividade dos complexos mitocondriais;
- Comprovar a fissão mitocondrial através de marcadores específicos como Drp1 por imunohisquímica;
- Investigar o efeito do tratamento com neopterina;
- Avaliar o metabolismo cerebral pela detecção da concentração das aminas biogênicas, BH4 e neopterina por cromatografia de alto desempenho (HPLC) acoplada à detecção fluorescente eletroquímica.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abeliovich A, Flint Beal M (2006) Parkinsonism genes: culprits and clues. *Journal of neurochemistry* 99:1062-1072.
- Akatsu H, Yamagata HD, Kawamata J, Kamino K, Takeda M, Yamamoto T, Miki T, Tooyama I, Shimohama S, Kosaka K (2006) Variations in the BDNF gene in autopsy-confirmed Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in Japan. *Dementia and geriatric cognitive disorders* 22:216-222.
- Arduino DM, Esteves AR, Swerdlow RH, Cardoso SM (2015) A cybrid cell model for the assessment of the link between mitochondrial deficits and sporadic Parkinson's disease. *Methods Mol Biol* 1265:415-424.
- Ashrafi G, Schwarz TL (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell death and differentiation* 20:31-42.
- Banati RB, Daniel SE, Blunt SB (1998) Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 13:221-227.
- Blandini F, Nappi G, Tassorelli C, Martignoni E (2000) Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol* 62:63-88.
- Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8:57-69.
- Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, Schaap O, Breedveld GJ, Krieger E, Dekker MC, Squitieri F, Ibanez P, Joesse M, van Dongen JW, Vanacore N, van Swieten JC, Brice A, Meco G, van Duijn CM, Oostra BA, Heutink P (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science* 299:256-259.
- Bracher A, Eisenreich W, Schramek N, Ritz H, Gotze E, Herrmann A, Gutlich M, Bacher A (1998) Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase. *The Journal of biological chemistry* 273:28132-28141.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B, Kozłowska E, Drela N, Chalimoniuk M, Stepień A (2008) Serum interleukin (IL-2, IL-

- 10, IL-6, IL-4), TNF α , and INF γ concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neuroscience letters* 441:158-162.
- Burch D, Sheerin F (2005) Parkinson's disease. *Lancet* 365:622-627.
- Campos-Sousa IS, Campos-Sousa RN, Ataíde Jr L, Soares MM, Almeida KJ (2010) Executive dysfunction and motor symptoms in Parkinson's disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 68:246-251.
- Cassarino DS, Halvorsen EM, Swerdlow RH, Abramova NN, Parker WD, Jr., Sturgill TW, Bennett JP, Jr. (2000) Interaction among mitochondria, mitogen-activated protein kinases, and nuclear factor-kappaB in cellular models of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 74:1384-1392.
- Chau CM, Evans MJ, Scarpulla RC (1992) Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the gamma-subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2 alpha, and tyrosine aminotransferase. Specific interaction of purified NRF-1 with multiple target genes. *The Journal of biological chemistry* 267:6999-7006.
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006) Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet neurology* 5:235-245.
- Ciechanover A, Brundin P (2003) The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron* 40:427-446.
- Corti O, Brice A (2013) Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease. *Current opinion in neurobiology* 23:100-108.
- Damiano M, Gautier CA, Bulteau AL, Ferrando-Miguel R, Gouarne C, Paoli MG, Pruss R, Auchere F, L'Hermitte-Stead C, Bouillaud F, Brice A, Corti O, Lombes A (2014) Tissue- and cell-specific mitochondrial defect in Parkin-deficient mice. *PloS one* 9:e99898.
- Doty RL, Deems DA, Stellar S (1988) Olfactory dysfunction in parkinsonism: a general deficit unrelated to neurologic signs, disease stage, or disease duration. *Neurology* 38:1237-1244.
- Duan L, Chen BY, Sun XL, Luo ZJ, Rao ZR, Wang JJ, Chen LW (2013) LPS-induced proNGF synthesis and release in the N9

- and BV2 microglial cells: a new pathway underlying microglial toxicity in neuroinflammation. *PloS one* 8:e73768.
- Dzambo N, Geczy CL, Halliday GM (2014) Inflammation is genetically implicated in Parkinson's disease. *Neuroscience*.
- Elzaouk L, Laufs S, Heerklotz D, Leimbacher W, Blau N, Resibois A, Thony B (2004) Nuclear localization of tetrahydrobiopterin biosynthetic enzymes. *Biochimica et biophysica acta* 1670:56-68.
- Evans MJ, Scarpulla RC (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *The Journal of biological chemistry* 264:14361-14368.
- Farrer MJ (2006) Genetics of Parkinson disease: paradigm shifts and future prospects. *Nature reviews Genetics* 7:306-318.
- Foxton RH, Land JM, Heales SJ (2007) Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease; potential pathogenic mechanisms. *Neurochemical research* 32:751-756.
- Frank-Cannon TC, Tran T, Ruhn KA, Martinez TN, Hong J, Marvin M, Hartley M, Trevino I, O'Brien DE, Casey B, Goldberg MS, Tansey MG (2008) Parkin deficiency increases vulnerability to inflammation-related nigral degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:10825-10834.
- Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F (2013) Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia* 61:112-120.
- Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ (2003) Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in *Drosophila* parkin mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4078-4083.
- Grunewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, Hemmelmann C, Lohmann K, Orolicki S, Ramirez A, Schapira AH, Pramstaller PP, Sue CM, Klein C (2010) Mutant Parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PloS one* 5:e12962.
- Gu M, Cooper JM, Taanman JW, Schapira AH (1998) Mitochondrial DNA transmission of the mitochondrial defect in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 44:177-186.

- Haas RH, Nasirian F, Nakano K, Ward D, Pay M, Hill R, Shults CW (1995) Low platelet mitochondrial complex I and complex II/III activity in early untreated Parkinson's disease. *Annals of neurology* 37:714-722.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Wood NW (2004) PINK, PANK, or PARK? A clinicians' guide to familial parkinsonism. *Lancet neurology* 3:652-662.
- Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP (2009) Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1beta and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain, behavior, and immunity* 23:309-317.
- Hirsch EC, Hunot S (2009) Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? *Lancet neurology* 8:382-397.
- Huang Y, Cheung L, Rowe D, Halliday G (2004) Genetic contributions to Parkinson's disease. *Brain research Brain research reviews* 46:44-70.
- Hunot S, Dugas N, Faucheux B, Hartmann A, Tardieu M, Debre P, Agid Y, Dugas B, Hirsch EC (1999) FcepsilonR2/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:3440-3447.
- Hwang M, Lee JM, Kim Y, Geum D (2014) Functional Role of Parkin against Oxidative Stress in Neural Cells. *Endocrinol Metab (Seoul)* 29:62-69.
- Imtiaz B, Tolppanen AM, Kivipelto M, Soininen H (2014) Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochemical pharmacology* 88:661-670.
- Itier JM, Ibanez P, Mena MA, Abbas N, Cohen-Salmon C, Bohme GA, Laville M, Pratt J, Corti O, Pradier L, Ret G, Joubert C, Periquet M, Araujo F, Negroni J, Casarejos MJ, Canals S, Solano R, Serrano A, Gallego E, Sanchez M, Deneffe P, Benavides J, Tremp G, Rooney TA, Brice A, Garcia de Yébenes J (2003) Parkin gene inactivation alters behaviour and dopamine neurotransmission in the mouse. *Human molecular genetics* 12:2277-2291.

- Jellinger K (1988) The pedunculopontine nucleus in Parkinson's disease, progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 51:540-543.
- Jeong YH, Kim Y, Song H, Chung YS, Park SB, Kim HS (2014) Anti-inflammatory effects of alpha-galactosylceramide analogs in activated microglia: involvement of the p38 MAPK signaling pathway. *PLoS one* 9:e87030.
- Kaufman S (1963) The Structure of the Phenylalanine-Hydroxylation Cofactor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50:1085-1093.
- Kelly DP, Scarpulla RC (2004) Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes & development* 18:357-368.
- Khan NL, Jain S, Lynch JM, Pavese N, Abou-Sleiman P, Holton JL, Healy DG, Gilks WP, Sweeney MG, Ganguly M, Gibbons V, Gandhi S, Vaughan J, Eunson LH, Katzenschlager R, Gayton J, Lennox G, Revesz T, Nicholl D, Bhatia KP, Quinn N, Brooks D, Lees AJ, Davis MB, Piccini P, Singleton AB, Wood NW (2005) Mutations in the gene LRRK2 encoding dardarin (PARK8) cause familial Parkinson's disease: clinical, pathological, olfactory and functional imaging and genetic data. *Brain : a journal of neurology* 128:2786-2796.
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998) Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 392:605-608.
- Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences* 19:312-318.
- Krige D, Carroll MT, Cooper JM, Marsden CD, Schapira AH (1992) Platelet mitochondrial function in Parkinson's disease. The Royal Kings and Queens Parkinson Disease Research Group. *Annals of neurology* 32:782-788.
- Kummer A, Teixeira AL (2009) Neuropsychiatry of Parkinson's disease. *Arquivos de neuro-psiquiatria* 67:930-939.
- Kuroda Y, Mitsui T, Kunishige M, Shono M, Akaike M, Azuma H, Matsumoto T (2006) Parkin enhances mitochondrial biogenesis in proliferating cells. *Human molecular genetics* 15:883-895.
- Lim KL, Ng XH, Grace LG, Yao TP (2012) Mitochondrial dynamics and Parkinson's disease: focus on parkin. *Antioxidants & redox signaling* 16:935-949.

- Lipton SA, Gu Z, Nakamura T (2007) Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. *International review of neurobiology* 82:1-27.
- Lucking CB, Durr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Deneffe P, Wood NW, Agid Y, Brice A (2000) Association between early-onset Parkinson's disease and mutations in the parkin gene. *The New England journal of medicine* 342:1560-1567.
- Macmillan-Crow LA, Cruthirds DL (2001) Invited review: manganese superoxide dismutase in disease. *Free radical research* 34:325-336.
- Martin CB, Ramond F, Farrington DT, Aguiar AS, Jr., Chevarin C, Berthiau AS, Caussanel S, Lanfumey L, Herrick-Davis K, Hamon M, Madjar JJ, Mongeau R (2013) RNA splicing and editing modulation of 5-HT(2C) receptor function: relevance to anxiety and aggression in VGV mice. *Molecular psychiatry* 18:656-665.
- Mayer B, John M, Bohme E (1990) Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor-role of tetrahydrobiopterin. *FEBS letters* 277:215-219.
- McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38:1285-1291.
- McNeill E, Channon K (2012) The role of tetrahydrobiopterin in inflammation and cardiovascular disease. *Thrombosis and Haemostasis* 108:832-839.
- Miklya I, Goltl P, Hafenschner F, Pencz N (2014) [The role of parkin in Parkinson's disease]. *Neuropsychopharmacologia Hungarica : a Magyar Pszichofarmakologiai Egyesulet lapja = official journal of the Hungarian Association of Psychopharmacology* 16:67-76.
- Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *Journal of neuroscience research* 50:1023-1029.
- Mizuno Y, Hattori N, Mori H, Suzuki T, Tanaka K (2001) Parkin and Parkinson's disease. *Current opinion in neurology* 14:477-482.

- Mizuno Y, Ohta S, Tanaka M, Takamiya S, Suzuki K, Sato T, Oya H, Ozawa T, Kagawa Y (1989) Deficiencies in complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and biophysical research communications* 163:1450-1455.
- Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJ, Klaffke S, Abou-Sleiman P, Olpin S, Wood NW, Willems PH, Smeitink JA, Cookson MR, Bandmann O (2008) Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Annals of neurology* 64:555-565.
- Muftuoglu M, Elibol B, Dalmizrak O, Ercan A, Kulaksiz G, Ogus H, Dalkara T, Ozer N (2004) Mitochondrial complex I and IV activities in leukocytes from patients with parkin mutations. *Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society* 19:544-548.
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* 183:795-803.
- Ni HM, Williams JA, Ding WX (2014) Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox biology* 4C:6-13.
- Palacino JJ, Sagi D, Goldberg MS, Krauss S, Motz C, Wacker M, Klose J, Shen J (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative damage in parkin-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 279:18614-18622.
- Pankratz ND, Wojcieszek J, Foroud T (1993) Parkinson Disease Overview. In: *GeneReviews*(Pagon, R. A. et al., eds) Seattle (WA).
- Parker WD, Jr., Boyson SJ, Parks JK (1989) Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Annals of neurology* 26:719-723.
- Parkinson J (2002) An essay on the shaking palsy. 1817. *The Journal of neuropsychiatry and clinical neurosciences* 14:223-236; discussion 222.
- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL (1997) Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 276:2045-2047.

- Porkert M, Sher S, Reddy U, Cheema F, Niessner C, Kolm P, Jones DP, Hooper C, Taylor WR, Harrison D, Quyyumi AA (2008) Tetrahydrobiopterin: a novel antihypertensive therapy. *Journal of human hypertension* 22:401-407.
- Prediger RD, Franco JL, Pandolfo P, Medeiros R, Duarte FS, Di Giunta G, Figueiredo CP, Farina M, Calixto JB, Takahashi RN, Dafre AL (2007) Differential susceptibility following beta-amyloid peptide-(1-40) administration in C57BL/6 and Swiss albino mice: Evidence for a dissociation between cognitive deficits and the glutathione system response. *Behavioural brain research* 177:205-213.
- Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, Knapp DJ, Crews FT (2007) Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia* 55:453-462.
- Ross CA, Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nature medicine* 10 Suppl:S10-17.
- Schapira AH (2006) Etiology of Parkinson's disease. *Neurology* 66:S10-23.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD (1990) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* 54:823-827.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1989) Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1:1269.
- Schon EA, Przedborski S (2011) Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 70:1033-1053.
- Schrag A, Horsfall L, Walters K, Noyce A, Petersen I (2015) Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. *The Lancet Neurology* 14:57-64.
- Siva N (2006) A new start for Parkinson's disease? *The Lancet Neurology* 5:24-25.
- Slavich GM, Irwin MR (2014) From stress to inflammation and major depressive disorder: a social signal transduction theory of depression. *Psychological bulletin* 140:774-815.
- Suen DF, Narendra DP, Tanaka A, Manfredi G, Youle RJ (2010) Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:11835-11840.

- Swerdlow RH, Parks JK, Miller SW, Tuttle JB, Trimmer PA, Sheehan JP, Bennett JP, Jr., Davis RE, Parker WD, Jr. (1996) Origin and functional consequences of the complex I defect in Parkinson's disease. *Annals of neurology* 40:663-671.
- Tansey MG, McCoy MK, Frank-Cannon TC (2007) Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. *Experimental neurology* 208:1-25.
- Thony B, Auerbach G, Blau N (2000) Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *The Biochemical journal* 347 Pt 1:1-16.
- Tobin JE, Cui J, Wilk JB, Latourelle JC, Laramie JM, McKee AC, Guttman M, Karamohamed S, DeStefano AL, Myers RH (2007) Sepiapterin reductase expression is increased in Parkinson's disease brain tissue. *Brain research* 1139:42-47.
- Tran TA, Nguyen AD, Chang J, Goldberg MS, Lee JK, Tansey MG (2011) Lipopolysaccharide and tumor necrosis factor regulate Parkin expression via nuclear factor-kappa B. *PloS one* 6:e23660.
- Tsang AH, Chung KK (2009) Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. *Biochimica et biophysica acta* 1792:643-650.
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, Albanese A, Nussbaum R, Gonzalez-Maldonado R, Deller T, Salvi S, Cortelli P, Gilks WP, Latchman DS, Harvey RJ, Dallapiccola B, Auburger G, Wood NW (2004) Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* 304:1158-1160.
- van der Kolk NM, Speelman AD, van Nimwegen M, Kessels RP, Int'Hout J, Hakobjan M, Munneke M, Bloem BR, van de Warrenburg BP (2014) BDNF polymorphism associates with decline in set shifting in Parkinson's disease. *Neurobiology of aging*.
- van der Merwe C, Loos B, Swart C, Kinnear C, Henning F, van der Merwe L, Pillay K, Muller N, Zaharie D, Engelbrecht L, Carr J, Bardien S (2014) Mitochondrial impairment observed in fibroblasts from South African Parkinson's disease patients with parkin mutations. *Biochemical and biophysical research communications* 447:334-340.

- Vila M, Przedborski S (2004) Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nature medicine* 10 Suppl:S58-62.
- Viveros OH, Lee CL, Abou-Donia MM, Nixon JC, Nichol CA (1981) Biopterin cofactor biosynthesis: independent regulation of GTP cyclohydrolase in adrenal medulla and cortex. *Science* 213:349-350.
- Wang KZ, Zhu J, Dagda RK, Uechi G, Cherra SJ, 3rd, Gusdon AM, Balasubramani M, Chu CT (2014) ERK-mediated phosphorylation of TFAM downregulates mitochondrial transcription: implications for Parkinson's disease. *Mitochondrion* 17:132-140.
- Werner ER, Werner-Felmayer G, Mayer B (1998) Tetrahydrobiopterin, cytokines, and nitric oxide synthesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 219:171-182.
- Westrate LM, Drocco JA, Martin KR, Hlavacek WS, MacKeigan JP (2014) Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. *PloS one* 9:e95265.
- Whitton PS (2007) Inflammation as a causative factor in the aetiology of Parkinson's disease. *British journal of pharmacology* 150:963-976.
- Widner B, Leblhuber F, Fuchs D (2002) Increased neopterin production and tryptophan degradation in advanced Parkinson's disease. *J Neural Transm* 109:181-189.
- Witte ME, Geurts JJ, de Vries HE, van der Valk P, van Horssen J (2010) Mitochondrial dysfunction: a potential link between neuroinflammation and neurodegeneration? *Mitochondrion* 10:411-418.
- Wooten GF, Currie LJ, Bovbjerg VE, Lee JK, Patrie J (2004) Are men at greater risk for Parkinson's disease than women? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 75:637-639.
- Wright Willis A, Evanoff BA, Lian M, Criswell SR, Racette BA (2010) Geographic and ethnic variation in Parkinson disease: a population-based study of US Medicare beneficiaries. *Neuroepidemiology* 34:143-151.
- Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 12:9-14.