

Cinara Ludvig Gonçalves

**MECANISMOS DE NEUROTOXICIDADE INDUZIDA PELA
ADMINISTRAÇÃO DE LPS E PARAQUAT**

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica do
Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina para obtenção do título de
Doutor em Bioquímica

Orientador: Prof. Dr. Marcelo
Farina

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Daniel
S. Prediger

Florianópolis

2017

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

Gonçalves, Cinara Ludvig
Mecanismos de neurotoxicidade induzida pela
administração de LPS e paraquat / Cinara Ludvig Gonçalves ;
orientador, Marcelo Farina ; coorientador, Rui Daniel
Schröder Prediger. - Florianópolis, SC, 2017.
124 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação Multidisciplinar em Saúde.

Inclui referências

1. Saúde. 2. Doença de Parkinson. 3. Paraquat. 4.
Lipopolissacarídeo. 5. Neurotoxicidade. I. Farina, Marcelo.
II. Prediger, Rui Daniel Schröder. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
Multidisciplinar em Saúde. IV. Título.

*Dedico esta tese aos meus pais,
por representarem o amor e a força
que me motivaram para chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, esta força que rege e ilumina meus passos.

Aos meus pais Darci e Norma, por serem meu maior exemplo de luta, determinação e amor. Agradeço imensamente a educação, suporte, incentivo e o lar amoroso que nos criaram. Agradeço também aos meus irmãos Davi, Cibelly, Kelly, aos meus sobrinhos Guilherme e aos que nasceram enquanto a titia Cinara estava fazendo o doutorado, Kiara, Anne e Isaac, obrigada por deixarem minha vida mais leve e doce.

Ao meu orientador, Prof. Marcelo, por quem tenho muita admiração e respeito, pela oportunidade e todo conhecimento que foi fundamental para o meu crescimento. Obrigada por me ensinar que a ética, a dedicação e o senso crítico são características essenciais em um pesquisador. Pelo carinho, apoio e incentivo meu eterno agradecimento.

Ao Prof. Rui, pelas valiosas contribuições que enriqueceram esta tese. Agradeço também pela sua amizade, apoio, receptividade e ensinamentos que agregaram na minha formação acadêmico-científica.

Aos meus amigos do laboratório Heloísa, Viviane, Sthéfani, Aline, Juliana, Diones, Renata, Dirleise, Marina, Mariana, Marcos, Débora e Mark, nestes 4 anos formamos uma grande família, onde todos sempre torceram pelo sucesso de seus membros. Obrigada por tornar os dias mais movimentados e cansativos (dia de experimento!) nas nossas recordações mais animadas e felizes. Um especial agradecimento à Danúbia pela grande ajuda (moral e técnica) na realização desta tese. Agradeço muito a sua valiosa paciência, motivação e conhecimento científico.

Também agradeço aos amigos que a UFSC me presenteou, Ana Cristina, Ariana, Daiane, Filipe, Vanessa, Vivian, Daniele e Josiel, os quais conheci nas minhas idas e vindas em busca de reagente, uma leitura no TECAN, uma companhia para tomar um café ou uma luz nas coisas da vida.

Aos meus amigos de longa data, Camila, Isabela, Gislaine e Micheli por estarem presentes (mesmo à distância) e prontos para tudo e a qualquer hora. Me sinto privilegiada pela amizade de vocês.

À Dra. Michelle Block pela ótima experiência proporcionada neste último ano de doutorado em seu laboratório (Indianápolis/EUA). Pelo carinho, acolhida, dedicação, paciência e orientação nos cultivos primários e em novas técnicas. Agradeço também aos colegas de laboratório e amigos Elaine, Eric, Richard e Madison pela amizade, companheirismo e cumplicidade.

Aos demais amigos que fiz em Indianápolis, Igor, Luiz, Brian, Paulo, Luciana, Cassia, Kate, Fernanda, Kinjal, Tarica, Asya e Anna. Obrigada por serem como uma família para mim e tornarem esta experiência tão positiva e inesquecível.

Aos professores da UFSC, do programa de pós-graduação em Bioquímica que me permitiram tanto aprendizado.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES e FAPESC pelas bolsas de estudo e auxílio financeiro.

RESUMO

Existem cada vez mais evidências indicando uma etiopatogenia multifatorial para a doença de Parkinson (DP). Neste estudo, investigou-se os potenciais efeitos neurotóxicos induzidos pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) ou pesticida paraquat (PQ) em camundongos, bem como pela interação destes, com ênfase em parâmetros relacionados à DP (alterações comportamentais, neuroquímicas e histológicas). Além disso, investigou-se o efeito “*priming*” do pré-tratamento com PQ seguido do tratamento com LPS em diferentes tipos de cultivo celular (cultivo primário e linhagem celular de microglia e astrócitos) sobre parâmetros relacionados com a inflamação e viabilidade celular. Nos estudos *in vivo*, camundongos machos *Swiss* foram submetidos a injeções intraperitoneais alternadas de LPS (3, 5 e 7 mg/kg/dia) e PQ (5 mg/kg/dia) durante uma semana. Vinte e quatro horas e 60 dias após a última administração, as funções olfativas, cognitivas e motoras dos animais foram avaliadas em testes comportamentais. Posteriormente, o sangue, o estriado e o córtex cerebral foram coletados para análises bioquímicas. A injeção periférica de LPS induziu um aumento transitório na permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE), o qual durou 5 dias. Notavelmente, a administração de LPS ou PQ causou deficiências olfativas e de memória de curto prazo aos 15 e 38 dias, respectivamente. Além disso, PQ e LPS, sozinhos ou em associação, foram capazes de inibir a atividade do complexo mitocondrial I no estriado dos animais. O LPS, sozinho ou em combinação, aumentou os níveis estriatais de 3-nitrotirosina. Em geral, o LPS induziu alterações significativas em diversos parâmetros (atividades estriatais do complexo I e catalase, níveis de 3-nitrotirosina, discriminação olfatória, reconhecimento social e desempenho motor) e estes eventos não foram significativamente alterados pela exposição ao PQ. Em relação aos dados derivados dos estudos *in vitro* com cultivo celular, houve um aumento significativo nos níveis de TNF- α (3 horas) e de nitrito (24 horas) nas células mesencefálicas pré-tratadas com PQ e tratadas com LPS quando comparados com aquelas tratadas apenas com LPS, sugerindo que o PQ é capaz de desencadear um efeito “*priming*” em cultivo mesencefálico primário de neurônio-glia. No entanto, não se observou o mesmo efeito

em cultivos celulares de micróglia primária, na linhagem de células microgliais (BV-2) e astrocitária (C6). Apesar da existência de estudos anteriores destacando a importância da hipótese de múltiplos *hits* no desenvolvimento da DP, os presentes achados *in vivo* não evidenciam a ocorrência de efeitos neurotóxicos sinérgicos ou aditivos de LPS e PQ no desenvolvimento de sintomas relacionados a DP em camundongos. No que se refere aos estudos *in vitro*, a exposição ao PQ deixa os neurônios dopaminérgicos mais propensos à inflamação e à morte celular.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, lipopolissacarídeo, paraquat.

ABSTRACT

A growing body of evidence indicates a multifactorial etiopathogeny for Parkinson's disease (PD). In this study, we investigated the potential neurotoxic effects induced by lipopolysaccharide (LPS) or the pesticide paraquat (PQ) in mice, as well as their interaction, with emphasis on PD-related outcomes (behavioral, neurochemical and histological alterations). Besides, it was investigated the *priming* effect of PQ pre-treatment followed by the treatment with LPS in different cell cultures (primary culture and microglia and astrocytes cells lines) on parameters related to inflammation and cell viability. *In vivo* studies were performed with Swiss male mice, which were subjected to alternate intraperitoneal injections of LPS (3, 5 and 7 mg/kg/day) and PQ (5 mg/kg/day) during one week. Twenty-four hours and 60 days after the last administration, olfactory, cognitive and motor functions of the animals were addressed in behavioral tasks. Thereafter, blood, striatum and cerebral cortex were collected for biochemical analyses. Peripheral injection of LPS induced a transient increase in blood-brain barrier (BBB) permeability that lasted 5 days. Notably, the administration of PQ or LPS caused marked olfactory and short-term memory impairments at 15 and 38 days, respectively. Besides, PQ and LPS, alone or in association, were able to inhibit mitochondrial complex I activity in the striatum of mice. LPS, alone or in combination, increased the striatal levels of 3-nitrotyrosine. Of note, LPS induced significant alteration in several parameters (striatal activities of complex I and catalase, levels of 3-nitrotyrosine, olfactory discrimination, social recognition and motor performance) and these events were not significantly altered by PQ exposure. Regarding the *in vitro* studies, there was a significant increase in TNF- α (3 hours) and nitrite content (24 hours) in mesencephalic cultures pre-treated with PQ and treated with LPS when compared with those treated with only LPS, suggesting that PQ is able to trigger a priming effect in primary mesencephalic cell culture. However no priming effect was observed in primary microglia cell culture, microglia cell line (BV-2) and astrocytes cell line (C6). Although the existence of previous studies highlighting the importance of the multiple hit hypothesis to the development of PD, the present *in vivo* findings do not support the occurrence of synergistic or additive neurotoxic effects of LPS and PQ in the development of PD-related

symptoms in mice. In relation to *in vitro* studies, PQ exposition renders dopaminergic neurons more prone to inflammation and thus to cell death.

Keywords: Parkinson's disease, lipopolysaccharide, paraquat.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo redox do PQ.....	28
Figura 2: A microgliose reativa e a neurotoxicidade progressiva.....	30
Figura 3: Linha do tempo descritiva protocolo experimental I: exposição sistêmica ao LPS e avaliação da permeabilidade da BHE em camundongos.....	42
Figura 4: Linha do tempo descritiva protocolo experimental II: exposição sistêmica ao LPS e diferentes doses PQ em camundongos.....	43
Figura 5: Linha do tempo descritiva protocolo experimental III: exposição sistêmica ao LPS e PQ em camundongos.....	44
Figura 6: Equipamento utilizado para avaliação do Escore Neurológico de Severidade de camundongos.....	46
Figura 7: LPS aumenta a permeabilidade da BHE em camundongos.....	60
Figura 8: Linha de tendência: LPS aumenta a permeabilidade da BHE em camundongos.....	61
Figura 9: Índice de sobrevivência de camundongos submetidos à administração sistêmica de LPS e PQ (10 mg/kg).....	62
Figura 10: Índice de sobrevivência de camundongos submetidos à administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg).....	62
Figura 11: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) no peso corporal de camundongos.....	63
Figura 12: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) no atividade locomotora espontânea de camundongos.....	64
Figura 13: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) no desempenho motor na barra giratória (<i>rotarod</i>).....	65
Figura 14: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) nos níveis de TH no estriado de camundongos.....	67
Figura 15: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no peso corporal de camundongos.....	69
Figura 16: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade de NADH desidrogenases (complexo I) no estriado (A) e córtex (B) e atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 24 horas após o tratamento.....	70
Figura 17: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade das enzimas glutatona redutase (GR) no estriado (A) e córtex (B) e glutatona peroxidase (GPx) no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 24 horas após o tratamento.....	71

Figura 18: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis de grupos tióis não proteicos (NPSH) no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 24 horas após o tratamento.....	71
Figura 19: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade da enzima catalase no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 24 horas após o tratamento.....	72
Figura 20: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis das enzimas malondialdeído (MDA)(A), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e 3-nitrotirosina (3-NT) no estriado de camundongos 24 horas após o tratamento.....	73
Figura 21: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste do escore neurológico de severidade (ENS) em camundongos adultos 2, 15, 30 e 60 dias após o tratamento.....	74
Figura 22: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste de campo aberto em camundongos adultos 2 dias após o tratamento.....	75
Figura 23: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste de discriminação olfatória em camundongos adultos 15 dias após o tratamento.....	76
Figura 24: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste de reconhecimento social em camundongos adultos 38 dias após o tratamento.....	77
Figura 25: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste da barra giratória “ <i>rotarod</i> ” em camundongos adultos 60 dias após o tratamento.....	78
Figura 26: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade de NADH desidrogenases (complexo I) no estriado (A) e córtex (B) e atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 60 dias após o tratamento.....	80
Figura 27: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade das enzimas glutatona redutase (GR) no estriado (A) e córtex (B) e glutatona peroxidase (GPx) no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 60 dias após o tratamento.....	81
Figura 28: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis de grupos tióis não proteicos (NPSH) no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 60 dias após o tratamento.....	82
Figura 29: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade da enzima catalase no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 60 dias após o tratamento.....	82
Figura 30: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis das enzimas malondialdeído (MDA)(A), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e 3-	

nitrotirosina (3-NT) no estriado de camundongos 60 dias após o tratamento.....	83
Figura 31: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no imunocontéudo de TH no estriado e substância negra de camundongos 60 dias após o tratamento.....	84
Figura 32: Efeitos do pré-tratamento com PQ (0,5 μ M) e do tratamento com LPS (5, 2,5 e 1 ng/mL) em células microgliais BV-2.....	87
Figura 33: Efeitos do pré-tratamento com PQ (0,5 μ M) e do tratamento com LPS (5 ng/mL) em células de cultivo primário de micróglia.....	88
Figura 34: Efeitos do pré-tratamento de PQ (0,5 μ M) e do tratamento com LPS (2,5 ng/mL) em células de cultivo primário mesencefálico de neurônio-glia de rato.....	89
Figura 35: Efeito do pré-tratamento com paraquat (0,5 μ M) e tratamento com LPS (2,5 ng/mL) na imunomarcção de neurônios TH+ em cultivo primário de neurônio-glia de rato.....	90
Figura 36: Efeito do pré-tratamento com paraquat (0,5 μ M) e tratamento com LPS (2,5 ng/mL) na imunomarcção de reatividade microglial (Iba-1) em cultivo primário de neurônio-glia de rato.....	91
Figura 37: Efeito do pré-tratamento de PQ (1 μ M) e do tratamento com LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) (A) ou LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) + TNF- α (60 ng/mL) em células astrocitárias C6.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS).....	46
Tabela 2: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) na análise plasmática de camundongos.....	66
Tabela 3: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) na atividade dos complexos I (CI) e II (CII) da cadeia respiratória mitocondrial; glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) no estriado de camundongos.....	67
Tabela 4: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade nos parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos 60 dias após o tratamento.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

3-NT	3-nitrotirosina
4-HNE	4-hidroxi-nonenal
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro
CPM	Cultivo primário de micróglia
CPN-G	Cultivo primário mesencefálico de neurônio-glia
BHE	Barreira hematoencefálica
DAB	3,3-diaminobenzidina
DJ-1	Proteína deglicase 1
DP	Doença de Parkinson
ECL	Quimioluminescência melhorada
EGF	Fator de crescimento epidermal
ERN	Espécie reativa de nitrogênio
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GBA	Glicocerebrosidase
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
IGF-1	Fator de crescimento dependente de insulina
IL-10	Interleucina 10
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
i.p.	Intraperitoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
LRRK-2	Cinase rica em repetições de leucina, do inglês <i>leucine-rich repeat kinase</i>
MEM	Meio essencial mínimo
MDA	Malondialdeído
MPTT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaFl	Fluoresceína de Sódio
NOS	Óxido nítrico sintase
NOX 2	NADPH oxidase 2
NPSH	Tióis não-proteicos
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos conservados

PINK-1	Fosfatase e cinase induzível tensina homóloga1, do inglês <i>PTEN induced putative kinase 1</i>
PQ	Paraquat
RANTES	Citocina membro da superfamília de interleucinas 8, do inglês, <i>Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
SFB	Soro fetal bovino
SNARE	Receptor SNAP proteína de anexo solúvel NSF, do inglês, <i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNpc	Substância negra <i>pars compacta</i>
TBS-T	Tampão tris-salina com tween 20
TGF α	fator de crescimento transformante α
TCA	Ácido tricloroacético
TH	Tirosina hidroxilase
TNF	Fator de necrose tumoral α
TLR-4	Toll-like receptor 4
UCH-L1	Ubiquitina hidrolase carboxil-terminal L1, do inglês <i>ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Doença de Parkinson	23
1.2 Paraquat e DP	26
1.3 Inflamação e DP	29
1.4 Lipolissacarídeo e modelos animais de DP	32
1.5 A hipótese dos múltiplos <i>hits</i>	34
2 JUSTIFICATIVA	37
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo Geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Estudos <i>in vivo</i>	41
4.1.1 Animais	41
4.1.2 Preparo das soluções de LPS e PQ	41
4.1.3 Protocolo Experimental I – Padronização do protocolo e dose de administração de LPS	41
4.1.4 Protocolo experimental II – padronização da dose de PQ	42
4.1.5 Protocolo experimental III – avaliação bioquímica e comportamental dos efeitos do protocolo LPS + PQ	43
4.1.6 Análises Comportamentais	44
4.1.6.1 Teste do campo aberto	44
4.1.6.2 Teste do Rotarod	45
4.1.6.3 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade (ENS)	45
4.1.6.4 Discriminação olfatória	46
4.1.6.5 Reconhecimento Social	47
4.1.7 Análise Bioquímica	47
4.1.7.1 Permeabilidade da BHE	47
4.1.7.2 Análise de parâmetros bioquímicos plasmáticos	48
4.1.7.3 Preparação tecidual para as análises bioquímicas	48
4.1.7.4 Atividade de GPx e GR	49
4.1.7.5 Atividade da catalase	49
4.1.7.6 Determinação do conteúdo de tióis não proteicos	49
4.1.7.7 Atividade dos complexo I (NADH desidrogenase) e complexo II da cadeia respiratória mitocondrial	50
4.1.7.8 <i>Western Blot</i>	50
4.1.7.9 <i>Dot Blot</i>	51
4.1.7.10 Dosagem de proteínas	51
4.1.8 Análises de imunoistoquímica	51
4.2 Estudos <i>in vitro</i>	52

4.2.1 Animais	52
4.2.2 Cultivo mesencefálico primário de neurônio-glia	52
4.2.3 Cultivo primário de micróglia	53
4.2.4 Cultivo de células microgliais BV-2	53
4.2.5 Cultivo de células astrocitárias C6	53
4.2.6 Tratamento <i>in vitro</i>	54
4.2.7 Ensaio de níveis de nitrito	54
4.2.8 Ensaio de viabilidade celular	55
4.2.9 Concentração de TNF- α	55
4.2.10 Captação de dopamina	55
4.2.11 Imunocitoquímica	56
4.3 Análise Estatística	56
5 RESULTADOS	59
5.1 CAPITULO I: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ em camundongos	59
5.1.1 Protocolo experimental I: Efeito da administração de diferentes doses de LPS sobre a permeabilidade da BHE	59
5.1.2 Protocolo experimental II: Efeito da administração de diferentes doses de PQ – padronização da dose de PQ	61
5.1.3 Protocolo experimental III: Efeito neurotóxicos da administração de LPS, PQ ou LPS + PQ	68
5.1.3.1 Efeitos agudos da administração sistêmica de LPS, PQ ou LPS + PQ no peso corporal, parâmetros relacionados ao metabolismo energético mitocondrial e estresse oxidativo	68
5.1.3.2 Efeitos da administração sistêmica de LPS, PQ ou LPS + PQ no comportamento de camundongos	73
5.1.3.3 Efeitos de longo prazo da administração sistêmica de LPS, PQ ou LPS + PQ nos parâmetros relacionados ao metabolismo energético mitocondrial, estresse oxidativo e na imunomarcção para TH	78
5.2 CAPITULO II: Efeitos do pré-tratamento com PQ e do tratamento com LPS em células neurais e gliais	85
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES	105
8 REFERÊNCIAS	107

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi primeiramente descrita pelo médico inglês James Parkinson (1755-1824), em 1817, em seu artigo “*An Essay on the Shaking Palsy*” (Um ensaio sobre a Paralisia Agitante). Ele identificou os principais aspectos da doença através da caracterização de casos observados nas ruas de Londres e em seus pacientes. Mais tarde, o neurologista francês Jean-Martin Charcot (1825-1893) renomeou a doença substituindo o nome “paralisia agitante” para DP em homenagem às contribuições do médico inglês e por acreditar que o termo previamente utilizado era inadequado (SAMII, NUTT e RANSOM, 2004). A DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa progressiva mais comum (atrás apenas da doença de Alzheimer), chegando a afetar 1,5-2% da população com mais de 60 anos (PAPPAS *et al.*, 2008). Em estudos epidemiológicos, a prevalência variou entre 167 a 5703 para cada 100.000 pessoas, e o índice parece ser consistentemente maior em homens do que em mulheres (WIRDEFELDT *et al.*, 2011).

A DP pode ser de origem genética (DP familiar), que representa menos de 10% dos casos, ou idiopática, a qual acomete mais de 90% dos casos. Até o momento, as pesquisas direcionadas aos casos de DP familiar encontraram 17 mutações (de herança dominante ou recessiva) em genes autossômicos que são responsáveis pelas variações da doença (YU *et al.*, 2011). Dentre eles, estão mutações em genes que codificam as proteínas α -sinucleína, parkina, ubiquitina hidrolase carboxil-terminal L1 (*ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1*, UCH-L1), DJ-1, fosfatase e cinase induzível tensina homologal (*PTEN induced putative kinase 1*, PINK-1), cinase rica em repetições de leucina (*leucine-rich repeat kinase*, LRRK-2) e glicocerebrosidase (GBA). As mutações em genes que codificam as proteínas parkina e LRRK-2 representam as alterações genéticas mais comuns relacionadas ao aparecimento precoce da doença, enquanto mutações em genes que codificam a proteína GBA parecem representar o fator de risco mais frequente (DEXTER e JENNER, 2013).

Por outro lado, a incidência da DP idiopática, responsável pela maior parte dos casos, está fortemente relacionada com a idade, geralmente se manifestando na quinta ou sexta década de vida. A etiologia da DP idiopática é considerada multifatorial, não estando muito clara a real contribuição de cada fator no início do processo neurodegenerativo (DE PABLOS *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2011; BLANDINI, 2013). Entre os fatores de risco associados, além da idade, estão a predisposição

genética, a exposição a toxinas ambientais, traumatismo craniano e infecções bacterianas e virais (KOPRICH *et al.*, 2008; BEKRIS, MATA e ZABETIAN, 2010; TANSEY e GOLDBERG, 2010). A exposição a pesticidas é um dos fatores mais intrigantes; apesar de alguns trabalhos questionarem seus efeitos neurotóxicos, estudos recentes de meta-análise, os quais avaliaram centenas de pesquisas epidemiológicas, evidenciaram a associação entre a exposição ocupacional a pesticidas e o risco de desenvolver a DP (PEZZOLI e CEREDA, 2013).

De modo geral, os pacientes com DP frequentemente apresentam sinais de comprometimento motor, como tremor de repouso, rigidez muscular, instabilidade postural e bradicinesia, tradicionalmente considerados manifestações clínicas características da doença (LANG e LOZANO, 1998; POEWE, 2008). Devido ao fato de diversas doenças (por exemplo, atrofia sistêmica múltipla e a paralisia supranuclear progressiva) apresentarem alguns ou todos os sinais citados anteriormente, definiu-se este conjunto de sintomas como uma síndrome clínica, o “parkinsonismo” (DICKSON, 2012). Por outro lado, recentemente, observou-se que o paciente com DP também apresenta sintomas não motores, tais como disfunções autonômicas, distúrbios do sono, sintomas neuropsiquiátricos e déficits cognitivos (POEWE, 2008; BLANDINI, 2013). Estes sintomas, também chamados de pré-motores, vêm sendo alvo de diversas pesquisas porque geralmente surgem antes do comprometimento do sistema motor, quando o processo neurodegenerativo já está consideravelmente avançado.

A principal característica anatomocitopatológica da DP é a morte progressiva e seletiva de neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc) que, juntamente com o estriado, globo pálido e núcleo subtalâmico, integra os núcleos da base. Os sintomas motores apresentados pelos pacientes são, em grande parte, devidos à significativa redução de dopamina nestas estruturas em um cenário que pode chegar a 70-80% de morte neural (BAZZU *et al.*, 2010). Isto explica o frequente diagnóstico tardio da DP e justifica a necessidade de estudos na área para melhorar o prognóstico dos pacientes. Os sintomas motores típicos podem ser reduzidos através do tratamento com levodopa, precursor de dopamina, que visa restabelecer a neurotransmissão dopaminérgica, ou ainda com agonistas dopaminérgicos. Contudo, muitos pacientes com DP apresentam sintomas resistentes à levodopa, sugerindo que sistemas não dopaminérgicos também sejam afetados, tais como os sistemas serotoninérgicos, noradrenérgico e colinérgico (HIRSCH *et al.*, 2003).

Além da perda neuronal, a DP é caracterizada pelo acúmulo de inclusões proteicas de α -sinucleína em diversas regiões do cérebro

(FORNO, 1996; SPILLANTINI *et al.*, 1998). A α -sinucleína é uma proteína predominantemente neuronal que, em situações fisiológicas normais, está localizada preferencialmente nos terminais pré-sinápticos, próximo às vesículas sinápticas (GEORGE, 2002). Acredita-se que a principal função da α -sinucleína seja controlar a liberação de neurotransmissores, através dos seus efeitos no complexo SNARE (proteínas que envolvidas em eventos de fusão de membrana, proteína de anexo solúvel NSF, do inglês receptor SNAP, *Soluble NSF Attachment Protein*), que atua na fusão da vesícula à membrana (CHANDRA *et al.*, 2005). Sabe-se que, com o avanço da idade, os níveis de α -sinucleína aumentam nos neurônios dopaminérgicos da SNpc e que isto está correlacionado com a diminuição na população destes neurônios (CHU e KORDOWER, 2007). Estas inclusões aglomeram-se no corpo celular do neurônio formando os chamados corpos de Lewy. Do mesmo modo, inclusões similares são encontradas em projeções de células neuronais conhecidas como neuritos de Lewy (IRIZARRY *et al.*, 1998). Alguns estudos ainda apontam para o acúmulo anormal de α -sinucleína inclusive no compartimento sináptico (MUNTANE *et al.*, 2008; SCHULZ-SCHAEFFER, 2010). Mais recentemente, foi demonstrado que a α -sinucleína normal, tanto em linhagens celulares como em cérebro humano e de camundongos, está presente em um subdomínio funcional distinto do retículo endoplasmático conhecido como membranas associada a mitocôndrias (MAM). Além disso, os pesquisadores também observaram que a α -sinucleína é capaz de modular a morfologia mitocondrial e que este efeito é alterado por mutações patogênicas nesta proteína (GUARDIA-LAGUARTA *et al.*, 2014).

Há um considerável número de evidências indicando que o processo patológico na DP não se inicia na SNpc. Os agregados de α -sinucleína e os corpos de Lewy parecem emergir do tronco encefálico inferior, seguindo um gradiente ascendente que se estende aos gânglios basais e termina no córtex cerebral (BRAAK *et al.*, 2006). No entanto, nem todos os pacientes seguem este padrão de propagação da doença (KALAITZAKIS *et al.*, 2008).

De um ponto de vista molecular/celular, sugerem-se que disfunções mitocondriais e lisossomais, agregação proteica, processamento anormal de proteínas, estresse oxidativo, alteração na via de sinalização das cinases e mecanismos neuroinflamatórios estejam envolvidos no processo de degeneração neuronal observado na DP (MCGEER e MCGEER, 2004b; CORTI, LESAGE e BRICE, 2011). Os casos de DP familiar revelaram mutações proteicas que refinaram a compreensão do envolvimento da mitocôndria na DP. Isto porque

praticamente todas as proteínas envolvidas na DP familiar estão associadas de algum modo com a disfunção mitocondrial (JENNER e OLANOW, 1996). Neste contexto, salienta-se que a SN é exposta a altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), em grande parte devido à abundância de dopamina citoplasmática, que é facilmente autooxidada, além do elevado conteúdo de ferro em neurônios dopaminérgicos. O catabolismo oxidativo da dopamina pode comprometer a respiração mitocondrial, conseqüentemente favorecendo a formação de EROs. Similarmente, a maior parte das neurotoxinas utilizadas como modelo animal de DP são toxinas mitocondriais e promovem dano oxidativo na via nigroestriatal (BERMAN e HASTINGS, 1999; PREMKUMAR e SIMANTOV, 2002).

1.2 Paraquat e DP

Por volta do ano de 1980, foi observado que a exposição à toxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) gerava danos cerebrais permanentes em humanos e primatas não-humanos. Os danos observados assemelhavam-se aos de uma síndrome parksoniana grave e irreversível: tremor, rigidez, lentidão no movimento, instabilidade postural (PRZEDBORSKI *et al.*, 2001). A semelhança estrutural entre o MPTP e o herbicida paraquat (PQ) impulsionou o estudo da relação entre exposição aos pesticidas e o desenvolvimento da DP (LANGSTON e BALLARD, 1983). De fato, diversos estudos apontam que a exposição a pesticidas está associada ao aumento no risco de desenvolver DP (KAMEL *et al.*, 2007; BALDERESCHI *et al.*, 2008; HANCOCK *et al.*, 2008). Um estudo de meta-análise, que avaliou mais de 200 pesquisas para verificar fatores de risco relacionados à DP, revelou que habitar áreas rurais, consumir água de poço e se expor a pesticidas são fatores de risco para desenvolver a DP (NOYCE *et al.*, 2012). Interessantemente, outro estudo deste gênero indicou um risco associado à DP significativamente aumentado de 2, 2 vezes para aqueles que se expuseram ao PQ (PEZZOLI e CEREDA, 2013).

O PQ (*N*, *N'*-dimetil-4,4'-bipiridina dicloreto) é um herbicida amplamente vendido em diversos países, comumente utilizado antes da semeadura devido ao seu amplo espectro de ação no controle de plantas daninhas em diferentes tipos de lavoura. No Brasil, o PQ é extensivamente vendido em um cenário onde o consumo de agrotóxicos apresenta elevado crescimento, transformando o país em um dos líderes mundiais no uso de agrotóxicos (SOARES, MORO e ALMEIDA, 2002).

Enquanto há um grande interesse na relação entre o PQ e a DP, as considerações geradas são amplamente debatidas. A razão para o ceticismo seria devido a sua dificuldade de cruzar a BHE e assim chegar no SNC; tal fato diminui seu efeito neurotóxico. De fato, um elaborado estudo de farmacocinética mostrou que, quando o PQ é administrado sistemicamente, via intraperitoneal, em camundongos C57BL/6J, apenas 0,3% da dose chega ao SNC e é então lentamente eliminado (BRECKENRIDGE *et al.*, 2013). O PQ é uma molécula bastante polar e não consegue atravessar facilmente a barreira hematoencefálica (BHE); após uma única administração, grande parte do PQ atinge as mediações cerebrais aparentemente associadas com estruturas externas a BHE, como a glândula pineal e o ventrículo cerebral. Apesar da semelhança estrutural com o MPTP, a forma divalente do PQ parece não utilizar o transportador de dopamina como se acreditava anteriormente (RICHARDSON *et al.*, 2005; RAMACHANDIRAN *et al.*, 2007). Sugere-se que este composto alcance o SNC através de um transportador de aminoácidos neutro, apesar de este fenômeno ocorrer de forma limitada (SHIMIZU *et al.*, 2001), ou ainda através do transportador orgânico de cátions OCT-2 e OCT-3 (CHEN *et al.*, 2007; RAPPOLD *et al.*, 2011).

Uma vez inserido no sistema biológico, acredita-se que a toxicidade do PQ seja mediada pela indução de um ciclo redox que utiliza NADPH como doador de elétrons com subsequente produção de radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que pode ser convertido em outras EROs (DAY *et al.*, 1999) (Figura 1). Alguns dos efeitos deletérios induzidos por PQ relacionam-se à inibição do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial quando administrado em altas doses. Entretanto, vale salientar que o PQ é capaz de desencadear efeitos neurotóxicos mesmo em camundongos nocaute para o gene que codifica a subunidade funcional do complexo I mitocondrial (CHOI *et al.*, 2008). Além disso, o PQ parece interferir no ciclo da glutatona (GSH), aumentando sua depleção, possivelmente por favorecer a via oxidativa de dopamina acoplada ao sistema antioxidante GSH da SN (KANG, GIL e KOH, 2009). Embora seja amplamente aceito que o principal mecanismo de toxicidade celular do PQ seja através do estresse oxidativo, é difícil chegar a uma conclusão definitiva sobre seus principais alvos intracelulares (BONNEH-BARKAY, LANGSTON e DI MONTE, 2005).

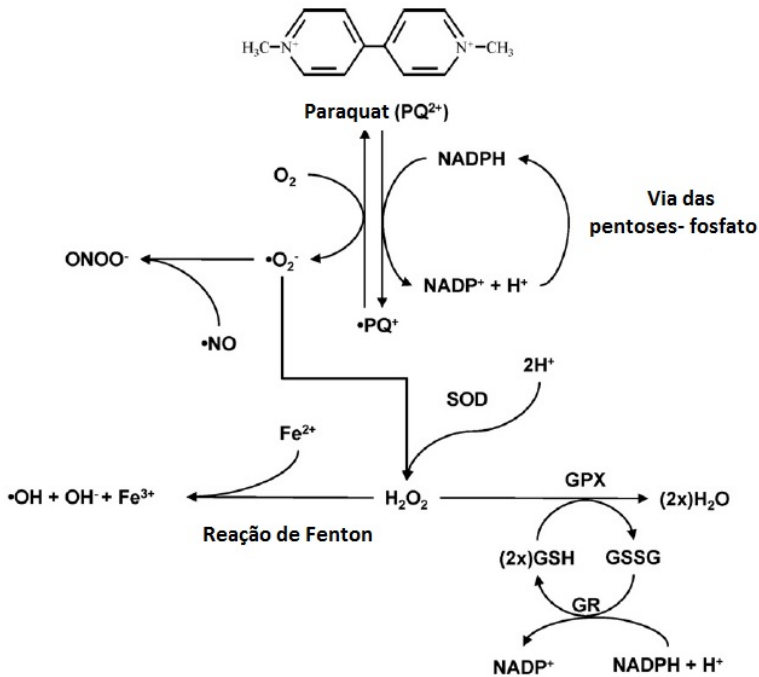


Figura 1. Ciclo redox do PQ. O PQ dication (PQ²⁺) é reduzido a PQ^{•+} por uma enzima redutora, que pode ser a NADPH citocromo P450 redutase. Na presença de O₂, PQ^{•+} é oxidado com concomitante produção de ânion superóxido (•O₂⁻). A enzima superóxido dismutase (SOD) dismuta o •O₂⁻ a H₂O₂ o qual é posteriormente metabolizado pela GPx. •O₂⁻ também pode reagir com óxido nítrico (ON) formando peroxinitrito (ONOO⁻). PQ²⁺ pode iniciar o ciclo redox novamente, levando a uma geração contínua de EROs e ao estresse oxidativo por esgotar as reservas intracelulares de GSH e NADPH. A acumulação de H₂O₂ pode ser convertida a radicais hidroxila •OH através de reação de Fenton. Adaptado de (FRANCO *et al.*, 2010).

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* utilizando pesticidas como PQ, rotenona e maneb têm demonstrado sua capacidade de desencadear eventos fisiopatológicos típicos da DP, tais como a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc, inclusões contendo α -sinucleína, (FRANCO *et al.*, 2010), estresse oxidativo e comprometimento na atividade de complexos da cadeia respiratória mitocondrial (CICCHETTI *et al.*, 2005; DRECHSEL e PATEL, 2008; TANNER *et al.*, 2011). A relação entre o herbicida PQ e a DP foi de tal modo significante que, assim como o

MPTP, começou a ser empregado como um modelo experimental da DP devido aos seus efeitos neurotóxicos. A administração sistêmica é a mais utilizada e os danos na via nigro estriatal são evidenciados em muitos trabalhos (BROOKS *et al.*, 1999; PENG *et al.*, 2004; CICCHETTI *et al.*, 2005).

Além disso, sugere-se que o PQ aumente os níveis de dopamina vesicular e citosólica, além de aumentar de modo transiente a atividade da tirosina hidroxilase (TH) e subsequente formação de quinoproteínas. Os autores atribuíram a estes achados um possível mecanismo de toxicidade do PQ no SNC, onde a vulnerabilidade dos neurônios dopaminérgicos ao PQ seria atribuída ao estresse mediado pelo aumento de dopamina endógena (IZUMI *et al.*, 2014).

É importante enfatizar que agentes com potencial redox podem interagir com diferentes doadores/acceptores de elétrons dependendo do potencial redox e redutor do ambiente. Embora seja comumente aceito que o PQ possa causar toxicidade celular por estresse oxidativo, é difícil chegar a uma conclusão definitiva acerca dos seus principais alvos intracelulares (BONNEH-BARKAY, LANGSTON e DI MONTE, 2005; BERRY, LA VECCHIA e NICOTERA, 2010).

1.3 Inflamação e DP

As respostas imunológicas no SNC são estritamente reguladas, um fenômeno descrito por *Sir Peter Medawar* como “imunologicamente protegido” (MEDAWAR, 1948). Esta regulação é, em parte, dependente da BHE, mas também modulada pela resposta das células residentes do cérebro, as micróglia e os astrócitos (e em menor extensão os neurônios). As micróglia são as principais células imunes residentes do SNC com um papel central nos processos inflamatórios, além de manter a homeostase através da produção de neurotrofinas (fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), fator de crescimento dependente de insulina (IGF-1)) e fatores anti-inflamatórios (interleucina 10 (IL-10)) (TAYLOR, MAIN e CRACK, 2013).

Geralmente, a micróglia se apresenta em seu estado inativo, caracterizada por sua morfologia ramificada. Mesmo “em repouso”, ela monitora constantemente o microambiente cerebral (NIMMERJAHN, KIRCHHOFF e HELMCHEN, 2005). Quando estimulada pelos mais variados estímulos, a micróglia é prontamente ativada e sofre uma transformação morfológica para uma forma ameboide, onde há um aumento na expressão de diversas moléculas de superfície (DAVALOS *et al.*, 2005; CHO *et al.*, 2006). Tal mudança morfológica ocorre por uma

completa ativação de fenótipos que inclui a resposta pró-inflamatória clássica (M1) e a forma alternativa (M2) (COLTON, 2009; CUNNINGHAM, 2013). Como uma célula imune inata, a micróglia pode se tornar ativa e assim produzir diversos fatores pró-inflamatórios (ex.: TNF- α , interleucina-1 β e EROs) em uma resposta M1 (DAVID e KRONER, 2011), sendo que muitos destes fatores são neurotóxicos (MCGEER e MCGEER, 2010). Em condições fisiológicas, a ativação de M1 precede a resposta M2, onde a ativação de M2a resulta na produção de fatores anti-inflamatórios (interleucinas 4, 10, 11, etc.) e a ativação de M2b regula a resposta de cura da lesão (COLTON, 2009; DAVID e KRONER, 2011). Enquanto a ativação microglial é necessária e essencial para a defesa do hospedeiro, uma ativação exagerada da micróglia, ou seja, a permanência no estágio M1 é neurotóxica (Figura 2) (MCGEER, KLEGERIS e MCGEER, 2005; TAYLOR, MAIN e CRACK, 2013).

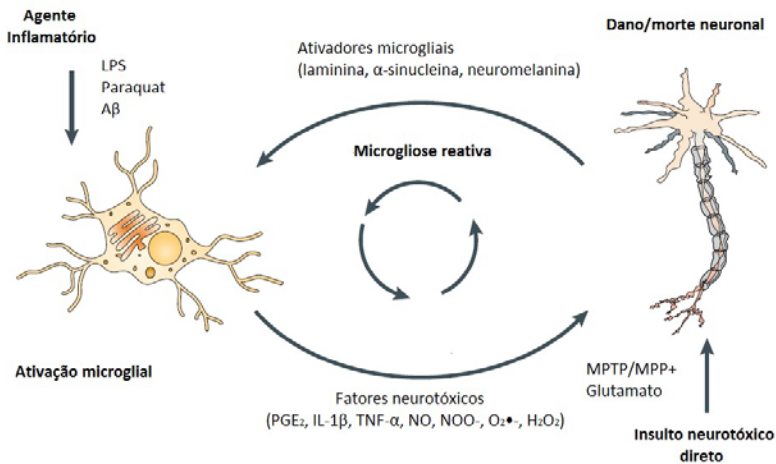


Figura 2. A micróglia reativa e a neurotoxicidade progressiva. A micróglia pode ser ativada e promover eventos neurotóxicos através de dois mecanismos: (i) a micróglia pode ser ativada através de estímulos pró-inflamatórios (LPS, PQ, peptídeos A β) e produzir fatores neurotóxicos pró-inflamatórios; (ii) a micróglia pode ser ativada em resposta ao dano neuronal (micróglia reativa), que por sua vez é tóxica para os neurônios vizinhos, resultando em um ciclo de perpetuação de morte neuronal. A β , peptídeo β -amilóide; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; IL-1 β , interleucina 1 β ; MPP⁺, 1-metil-4-fenilpiridínio; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetra-hidropiridina; NO, óxido nítrico; NOO⁻, peroxinitrito; O₂^{•-}, radical superóxido; PGE₂, Prostaglandina E₂; TNF- α , fator de necrose tumoral- α . Adaptado de (BLOCK, ZECCA e HONG, 2007).

A micróglia pode ser ativada por dois tipos de sinais: a estimulação direta da micróglia por toxinas ambientais ou o estímulo vindo de proteínas endógenas e dano neuronal. Felizmente, sinais regulatórios protetores endógenos no cérebro foram identificados como inibidores da hiperativação microglial, tais como neuropeptídeos (BLOCK *et al.*, 2006), canabinóides (RIVEST, 2006), citocinas anti-inflamatórias (BOCHE *et al.*, 2006), estrogênio (JOHNSON *et al.*, 2006), glicocorticóides (GLEZER e RIVEST, 2004) e até mesmo a apoptose microglial (DRAGUNOW *et al.*, 2006).

Em 1988, Mc Geer e colaboradores observaram, pela primeira vez, a presença de micróglia ativadas em cérebro *post mortem* de pacientes com DP (MCGEER *et al.*, 1988). Este achado foi confirmado por outros pesquisadores utilizando diferentes marcadores inflamatórios (BANATI, DANIEL e BLUNT, 1998; IMAMURA *et al.*, 2003). Análises revelaram aumento nas concentrações de TNF α , microglobulina β_2 , fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento transformante α (TGF- α), TGF- β_1 , e interleucinas-1 β , 6, e 2 no estriado (MOGI *et al.*, 1994a; MOGI *et al.*, 1994b; MOGI *et al.*, 1996). Também já foi detectado TNF α , interleucina 1 β , e interferon- γ na SNpc de pacientes (HUNOT *et al.*, 1999).

Estudos *in vivo*, realizados com pacientes, também confirmam o envolvimento de fatores neuroinflamatórios na DP. Análise de soro de pacientes apresentaram aumento da expressão de interleucina 2, TNF- α , interleucina 6, e RANTES (*Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*, citocina membro da superfamília de interleucinas 8) (DOBBS *et al.*, 1999; RENTZOS *et al.*, 2007). Juntos, estes achados indicam que modulações inflamatórias são detectáveis durante o curso da doença e parecem estar relacionadas com a progressão desta. De modo interessante, neurônios dopaminérgicos expressam receptores de citocinas, sugerindo que sejam sensíveis a estas. É o caso do receptor de TNF α -1, que é expresso em neurônios dopaminérgicos (BOKA *et al.*, 1994) e cuja expressão está aumentada em pacientes com DP (MOGI *et al.*, 2000).

Estudos recentes relataram elevada densidade de células T CD8 e CD4 positivas no cérebro de pacientes com DP. Estas células estavam próximas a vasos sanguíneos (sugerindo migração da corrente sanguínea) e de neurônios dopaminérgicos (BROCHARD *et al.*, 2009). Tais achados indicam que células periféricas podem de fato entrar no parênquima cerebral durante processos neurodegenerativos, sugerindo mudanças na integridade da BHE. De fato, mudanças patológicas na microanatomia de capilares no cérebro de pacientes com DP já foram relatadas (FARKAS

et al., 2000). A origem destas mudanças ainda não está bem esclarecida. Sabe-se que a microglia ativada pode liberar ERO que por sua vez podem estimular a angiogênese; sugere-se que estas moléculas possam também modificar os capilares cerebrais, facilitando a entrada de células periféricas como os linfócitos no SNC (HIRSCH e HUNOT, 2009).

Como mencionado anteriormente, a BHE exerce um papel fundamental na proteção do SNC através de sua complexa seletividade. O aumento da permeabilidade da BHE e a inflamação são eventos críticos na patologia de diversas doenças neurodegenerativas, comprometendo a unidade vascular e favorecendo a migração de leucócitos para dentro do parênquima cerebral (STOLP e DZIEGIELEWSKA, 2009). Neste cenário, o conceito de que o cérebro é um local imunologicamente privilegiado está sendo gradualmente eliminado; recentemente foi observada a presença de vasculatura linfática funcional nas meninges. Um estudo recente encontrou linfócitos T alinhados ao longo de estruturas endoteliais que se situavam paralelamente ao seio dural venoso (vasos que drenam o sangue vindo do cérebro para dentro das veias jugulares internas). Além de uma nova visão da anatomia cerebral, tais evidências proporcionam uma nova discussão em torno dos mecanismos subjacentes a doenças neurológicas. Uma modificação nestes vasos linfáticos poderiam ser a causa primária de diversas doenças neurodegenerativas associadas a alterações do sistema imune (LOUVEAU *et al.*, 2015).

Cabe salientar aqui que, através de mudanças na neuroplasticidade, células do sistema imune podem influenciar uma variedade de condições cerebrais. Fatores pró-inflamatórios (IL-1 β , TNF- α) conduzem a déficits neuroplásticos, enquanto fatores anti-inflamatórios e citocinas neurotróficas aumentaria a neuroplasticidade e poderiam até ter efeitos neuroprotetores e regenerativos (HAYLEY e LITTELJOHN, 2013). É importante considerar os aspectos protetores e destrutivos do sistema imune bem como o microambiente no qual estas moléculas atuam (HAYLEY, 2014).

1.4 Lipopolissacarídeo e modelos animais de DP

O lipopolissacarídeo (LPS) é uma endotoxina presente na membrana externa de bactérias gram negativas, amplamente utilizado para desencadear a resposta imune em modelos experimentais (LIU e BING, 2011). O LPS se liga a receptores específicos nas células hospedeiras promovendo assim sua estimulação onde ocorre a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (TAKEDA, KAISHO e AKIRA, 2003). Sabe-se que a injeção sistêmica de LPS promove o

aumento da transcrição de receptores de membrana em populações celulares específicas incluindo a micróglia no cérebro (LACROIX, FEINSTEIN e RIVEST, 1998). Ele ativa os receptores *Toll-like 4* (TLR-4), os quais estão amplamente expressos na micróglia (SANCHEZ-GUAJARDO *et al.*, 2013). Interessantemente, diversos estudos (*in vitro* e *in vivo*) têm mostrado que o LPS promove a ativação da micróglia e a perda progressiva e cumulativa de neurônios dopaminérgicos ao longo do tempo (GAO *et al.*, 2002; LIU, 2006). Outros estudos indicam que algumas citocinas incluindo TNF- α e IL-1 podem ser transportadas através do BHE, e afetar diretamente as funções do SNC (BANKS, 2005). Diante de tais achados o LPS foi incluído no quadro de neurotoxinas, ao lado de 6-OHDA e do MPTP, como possíveis indutores de dano dopaminérgico em modelos animais para o estudo da DP.

Muitos autores justificam este efeito do LPS devido a maior susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos à inflamação quando comparados com outros subtipos neurais (GAO *et al.*, 2002; LING *et al.*, 2002; CARVEY *et al.*, 2003; BLOCK e HONG, 2005). Outro fato que tornaria a SNpc mais suscetível ao insulto inflamatório é que ela contém 4,5 vezes mais micróglia quando comparada com outras regiões cerebrais (KIM *et al.*, 2000). Os modelos de DP com LPS baseiam-se na ativação microglial, onde a micróglia ativa libera fatores neurotóxicos e pró-inflamatórios como IL-1 e 6, TNF- α , e óxido nítrico (ON) que, por sua vez, são capazes de desencadear o dano neural (ARIMOTO *et al.*, 2007; CHOI, ZHANG e BING, 2010). Geralmente, esta resposta inflamatória exacerbada potencializa o dano neuronal através da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO/ERN). Por sua vez, neurônios danificados podem emitir sinais de lesão, tais como neuromelanina e α -sinucleína, que são capazes de desencadear a microgliose, caracterizando um ciclo de ativação constante que conduz a morte neuronal (ZHANG *et al.*, 2005; GAO e HONG, 2008; ZECCA *et al.*, 2008).

A ativação microglial exagerada também aumenta a neurodegeneração existente. Por exemplo, estudos mostram que o LPS aumenta sinergicamente a ativação microglial e os efeitos neurotóxicos da rotenona (GAO *et al.*, 2003a) e do MPTP (GAO *et al.*, 2003b), indicando que a superativação microglial é capaz de amplificar a neuroinflamação e a neurotoxicidade associada. Além disso, a inflamação sistêmica e local induzida pelo LPS em camundongos adultos também é capaz de aumentar o dano neuronal (CUNNINGHAM *et al.*, 2005).

Interessantemente, pesquisas utilizando modelos animais de DP mostraram que o tratamento com anti-inflamatórios como o rofecoxib,

celecoxib e indometacina apresenta efeito protetor nos neurônios da SNpc (KURKOWSKA-JASTRZEBSKA *et al.*, 2002; SANCHEZ-PERNAUTE *et al.*, 2004; ESPOSITO *et al.*, 2007).

Apesar do grande avanço nos últimos anos na compreensão das bases moleculares da DP e das via de morte celular, algumas questões ainda permanecem sem resposta: porque as células da SN são mais vulneráveis? Quais mecanismos estão por trás da morte celular progressiva das células na SN? O que os corpos de Lewy e a α -sinucleína nos dizem sobre a progressão da doença? Neste contexto, os estudos *in vivo* com animais parecem representar importantes ferramentas para se estudar a patogênese da DP (BLESA e PRZEDBORSKI, 2014). Atualmente, tem-se observado que os modelos de DP que utilizam agentes neurotóxicos conseguem mimetizar algumas das características da doença, enquanto os modelos genéticos reproduzem outras. Desta forma, torna-se de suma importância considerar que a DP é uma doença multifatorial e que não há um modelo (tóxico ou genético) que reproduza totalmente a complexa condição patológica encontrada em humanos (JACKSON-LEWIS, BLESA e PRZEDBORSKI, 2012).

1.5 A hipótese dos múltiplos *hits*

Estudos primariamente conduzidos pelo grupo de pesquisadores coordenados por Cory-Slechta sugeriram que a exposição ao herbicida PQ e ao maneb (pesticida ditiocarbamato) durante o período pré-natal e perinatal poderia reduzir o número de neurônios dopaminérgicos e aumentar a susceptibilidade à degeneração após um subsequente insulto ambiental ou como resultado do envelhecimento. Esta sensibilização parece ser alcançada de modo semelhante quando ocorre a exposição a agentes pró-inflamatórios como o LPS. A teoria propõe um estado de sensibilização promovido por um agente ambiental que poderia interferir no aparecimento precoce do parksonismo (THIRUCHELVAM *et al.*, 2002; CORY-SLECHTA *et al.*, 2005).

A hipótese de múltiplos *hits* considera o impacto de vários fatores de risco que têm como alvo o SNC. Especificamente, o encéfalo muitas vezes parece ser capaz de compensar prontamente o efeito nocivo de um único agente que atua em uma estrutura específica. No entanto, quando múltiplos alvos ou sítios funcionais de um particular sistema são atacados por diferentes mecanismos (por exemplo, exposição a compostos químicos combinados com outro fator de risco), o sistema pode não ser mais capaz de se autorregular e recuperar a homeostase, deste modo levando a um dano contínuo ou cumulativo (CORY-SLECHTA *et al.*,

2005). O que se tem observado nos casos de DP é que interações entre distintos processos patológicos parecem contribuir para a degeneração dos neurônios dopaminérgicos; dentre eles estão os processos inflamatórios, os quais têm sido associados ao desenvolvimento e progressão da doença (KIM e JOH, 2006; BLOCK, ZECCA e HONG, 2007).

Um fato interessante acerca das células microgliais foi mostrado em um estudo com modelo animal de DP, onde se observou o aumento de RNA mensageiro da IL-1 β na SNpc, mas não a translocação desta citocina (DEPINO *et al.*, 2003). Tal achado motivou a ideia da micróglia “*primed*” para descrever um estado atípico desta célula, o qual precede uma adicional ativação microglial neurotóxica como consequência de um segundo estímulo pró-inflamatório (CUNNINGHAM *et al.*, 2005).

Estudos com roedores pré-tratados com LPS mostraram um aumento nos danos promovidos pelo PQ e este efeito foi associado com uma elevada resposta neuroinflamatória dependente de micróglia (PURISAI *et al.*, 2007; MANGANO e HAYLEY, 2009; MANGANO *et al.*, 2011). Além disso, o PQ também é capaz de promover um modesto, mas significativo efeito neurodegenerativo que é marcadamente aumentado quando os animais são previamente expostos ao LPS (via intracerebroventricular). Estes dados sugerem que a sensibilização (“*priming*”) inflamatória pode influenciar na sensibilidade neuronal dopaminérgica a uma subsequente exposição a toxinas ambientais (MANGANO e HAYLEY, 2009).

De modo semelhante, o estudo desenvolvido por Purisai e colaboradores demonstrou que a administração de três injeções semanais de PQ em camundongos promoveu uma significativa perda de neurônios dopaminérgicos na SN, além de aumentar os níveis de α -sinucleína. Por outro lado, uma única injeção de PQ não produziu efeitos tóxicos evidentes; os danos oxidativos e efeitos neurotóxicos foram observados somente com as exposições subsequentes. Sugeriu-se então que isto ocorreu devido ao efeito acumulativo do PQ, ou ainda, a exposição inicial pode ter atuado como um efeito sensibilizante não letal, aumentando a vulnerabilidade neuronal diante de um segundo insulto tóxico que uma vez desencadeado seu dano se torna irreversível (PURISAI *et al.*, 2007). Dados *in vitro* mostram que células neuronais dopaminérgicas co-cultivadas com micróglia apresentaram um aumento na acumulação e toxicidade induzida pelo PQ, que foi atenuada pelo inibidor de NADPH oxidase 2 (NOX 2), apocinina, sugerindo que a via de ativação microglial via NOX 2 pode estar envolvida na neurotoxicidade induzida pelo PQ

(RAPPOLD *et al.*, 2011). Em resumo, a neuroinflamação parece ser uma força propulsora para a neurodegeneração (GAO e HONG, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Com o crescente aumento da expectativa de vida, os estudos acerca de doenças associadas ao envelhecimento merecem destaque. Neste contexto, a DP é de grande relevância, pois representa a segunda doença neurodegenerativa mais prevalente no cenário mundial. Além disso, pouco se sabe sobre os fatores ambientais desencadeantes da doença, bem como se há uma possível interação entre eles. Neste sentido, pesquisas recentes têm mostrado que a neuroinflamação parece exercer um papel chave em diversas doenças do SNC; ainda, agentes neurotóxicos, como pesticidas, poderiam favorecer eventos neuroinflamatórios, interferindo na homeostase celular e favorecendo a morte neuronal. A inflamação (induzida por LPS) e a exposição ao PQ têm sido amplamente estudadas isoladamente e, de fato, foram comprovados efeitos neurotóxicos para ambas – através de distintos mecanismos. No entanto, estudos relacionados à inflamação e a maior susceptibilidade à DP apresentam alguns resultados controversos e deixam muitas questões abertas. Além disso, pouco se sabe sobre a etiologia da DP, a participação efetiva dos fatores de risco associados e principalmente sobre a interação de tais fatores, como por exemplo, a inflamação (LPS) e a exposição a um pesticida (PQ).

Assim, o presente trabalho baseia-se na “*hipótese de múltiplos hits*” e visa investigar os mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela administração sistêmica da endotoxina LPS e do herbicida PQ em camundongos adultos, bem como o possível efeito sensibilizante do PQ *in vitro*, em células mesencefálicas. A compreensão dos mecanismos envolvidos no possível efeito sinérgico ou aditivo da inflamação (LPS) e da exposição ao herbicida PQ no que se refere à toxicidade dopaminérgica possibilitará novas abordagens preventivas e terapêuticas nas pesquisas da DP. Este entendimento parece ser de grande relevância diante da crescente exposição a pesticidas e invariavelmente a eventos inflamatórios aos quais a maioria da população está submetida. Assim, a hipótese do presente trabalho é que a exposição sistêmica de camundongos adultos saudáveis ao LPS favorece a neurotoxicidade do PQ devido ao aumento na permeabilidade da BHE promovido pela endotoxina, além dos efeitos neurotóxicos particulares do LPS e do PQ.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar os potenciais efeitos neurotóxicos (e mecanismos relacionados) da administração sistêmica de LPS e/ou PQ em camundongos adultos, com ênfase em alterações bioquímicas e comportamentais relacionadas à DP; além de avaliar o potencial efeito sensibilizante do pré-tratamento *in vitro* com PQ na resposta inflamatória em cultivos celulares posteriormente expostos ao LPS.

3.2 Objetivos específicos

1. Desenvolver um protocolo experimental de exposição sistêmica de camundongos adultos ao LPS, visando à ocorrência de alterações na permeabilidade da BHE;
2. Com base no objetivo 1, desenvolver um protocolo experimental de exposição sistêmica de camundongos adultos ao LPS e PQ, a fim de mimetizar uma condição de exposição a múltiplos *hits* (desafios);
3. Investigar os efeitos da exposição sistêmica de camundongos adultos ao LPS e/ou PQ sobre parâmetros bioquímicos, tais como a atividade de enzimas do sistema antioxidante (GR, GPx, NPSH e catalase), metabolismo mitocondrial (complexos I e II), marcadores de estresse oxidativo (MDA, 4-HNE e 3-NT) bem como, marcadores plasmáticos de perfil hepático, renal e lipídico.
4. Investigar os efeitos da exposição sistêmica de camundongos adultos ao LPS e/ou PQ sobre o imunoconteúdo de TH.
5. Investigar os efeitos da exposição sistêmica de camundongos adultos ao LPS e/ou PQ sobre parâmetros comportamentais locomotores, cognitivos e olfatório.
6. Comparar os efeitos das exposições individuais ao LPS ou PQ com os efeitos das exposições simultâneas (LPS + PQ) no intuito de evidenciar possíveis eventos aditivos e/ou sinérgicos.
7. Avaliar o potencial efeito sensibilizante do pré-tratamento *in vitro* do PQ em cultivo mesencefálico primário de neurônio-glia, cultivo primário microglial, células microgliais

BV-2 e células astrocíticas C6, seguido da exposição ao LPS sob parâmetros inflamatórios (níveis de TNF- α e de nitrito), viabilidade e atividade celular (MTT e captação de dopamina), além de análises morfológicas pela imunomarcação de TH e IBA-1.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estudos *in vivo*

4.1.1 Animais

Camundongos *Swiss* machos foram obtidos do Biotério Central da UFSC, com 10-12 semanas. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 21 ± 2 °C e ciclo claro/escuro 12/12 horas (7:00-19:00 h). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo de número PP00765.

4.1.2 Preparo das soluções de LPS e PQ

O dicloreto de paraquat e o LPS de *Escherichia coli* (0111:B4) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Ambos foram diluídos em solução de cloreto de sódio 0,9% (solução salina). A administração das soluções foi realizada pela cavidade intraperitoneal.

4.1.3 Protocolo Experimental I – Padronização do protocolo e dose de administração de LPS

Com o objetivo de avaliar o efeito do LPS na permeabilidade da BHE, foi utilizado o seguinte protocolo experimental (Figura 3). Os animais foram divididos em dois grupos ($n = 49$, total 98 animais): (i) grupo controle, no qual os animais receberam somente o veículo (solução salina, 10 mL/kg), e grupo LPS, cujos animais receberam as doses 3 mg/kg, 5 mg/kg e 7 mg/kg, nos dias 1, 3 e 5, respectivamente). Para a análise do efeito da administração do LPS em diferentes tempos, sete subgrupos foram estabelecidos. Para cada tempo de análise (dias 2, 4, 6, 8, 11, 15 e 22), 7 animais do grupo controle e 7 animais do grupo LPS foram eutanasiados para análise da permeabilidade da BHE com fluoresceína sódica (NaFl) no córtex e no estriado.

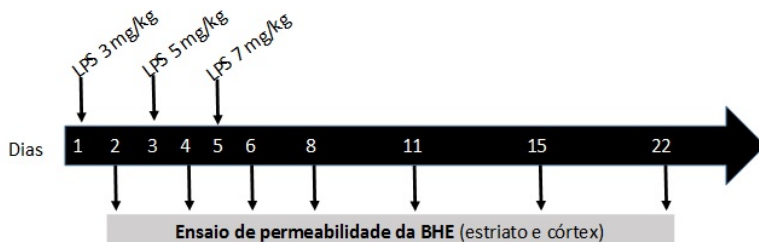


Figura 3. Linha do tempo descritiva protocolo experimental I: exposição sistêmica ao LPS e avaliação da permeabilidade da BHE em camundongos. Camundongos machos adultos foram expostos ao LPS (3, 5 e 7 mg/kg, i.p.) nos dias 1, 3 e 5, respectivamente. Os animais do grupo controle receberam solução salina nos mesmos dias. Nos dias 2, 4, 6, 8, 11, 15 e 22 após administração de LPS (grupo teste) ou salina (grupo controle) foram realizadas as análises de permeabilidade da BHE pelo teste de NaFl.

4.1.4 Protocolo experimental II – padronização da dose de PQ

Com o objetivo de encontrar a dose de PQ adequada para a administração associada ao LPS, foi necessário realizar uma curva de dose do PQ. Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6, total 30 animais): i) grupo controle; ii) grupo LPS+PQ 1 mg/kg; iii) grupo LPS+PQ 3 mg/kg; iv) grupo LPS+PQ 5 mg/kg; v) grupo LPS+PQ 7 mg/kg. Os animais foram submetidos a uma semana de administrações de LPS e PQ (nas diferentes doses, via i.p.) intercaladas: nos dias 1, 3 e 5, os animais receberam 3 mg/kg, 5 mg/kg e 7 mg/kg de LPS, respectivamente e, nos dias 2, 4, 6 e 7, os animais receberam a dose de PQ correspondente a cada grupo teste (Figura 4). Trinta dias após a última injeção de PQ, os animais foram anestesiados, o sangue coletado e em seguida eutanasiados por decapitação e os estriados foram coletados para posteriores análises bioquímicas. Além disso, o peso dos animais foi monitorado semanalmente para adequação das doses e para observar uma possível toxicidade do protocolo adotado. Testes comportamentais foram realizados nos dias 1, 9, 15 e 30, conforme descritos a seguir.

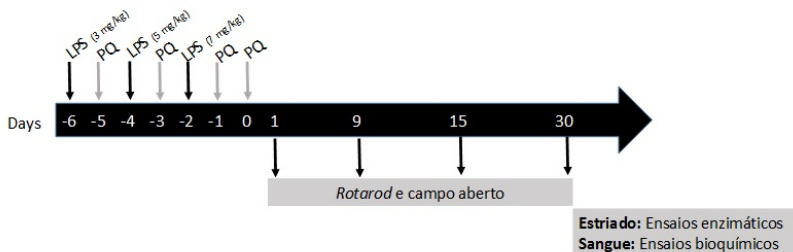


Figura 4. Linha do tempo descritiva protocolo experimental II: exposição sistêmica ao LPS e diferentes doses PQ em camundongos. Camundongos machos adultos foram expostos ao LPS (3, 5 e 7 mg/kg, i.p.) nos dias 1, 3 e 5, respectivamente, e ao PQ (1, 3, 5 ou 7 mg/kg, onde cada grupo teste foi tratado com uma dose diferente de PQ) nos dias -5, -3, -1 e 0. Os animais do grupo controle receberam solução salina nos 7 dias de injeções. Nos dias 1, 9, 15 e 30 após a última administração de PQ ou salina (dia zero) foram realizados os testes comportamentais campo aberto e *rotarod*. Trinta dias após a última administração de PQ ou salina (dia zero) os animais foram eutanasiados e o estriado e o sangue coletados para análises bioquímicas.

4.1.5 Protocolo experimental III – avaliação bioquímica e comportamental dos efeitos do protocolo LPS + PQ

Baseado no protocolo/dose de administrações de LPS e PQ previamente padronizado, o próximo objetivo foi verificar os efeitos neurotóxicos da associação destes insultos. Os animais foram divididos em 4 grupos: i) grupo controle; ii) grupo LPS; iii) grupo PQ; iv) grupo LPS+PQ. Os animais foram submetidos a uma semana de administrações de LPS e PQ (nas diferentes doses, via i.p.) intercaladas: nos dias 1, 3 e 5, os animais receberam 3 mg/kg, 5 mg/kg e 7 mg/kg de LPS, respectivamente e, nos dias 2, 4, 6 e 7, os animais receberam 5 mg/kg de PQ. As avaliações bioquímicas foram realizadas 24 h e 60 dias após a última administração de PQ. Ao longo deste período foram realizados testes comportamentais, em diferentes tempos, conforme descrito na Figura 5.

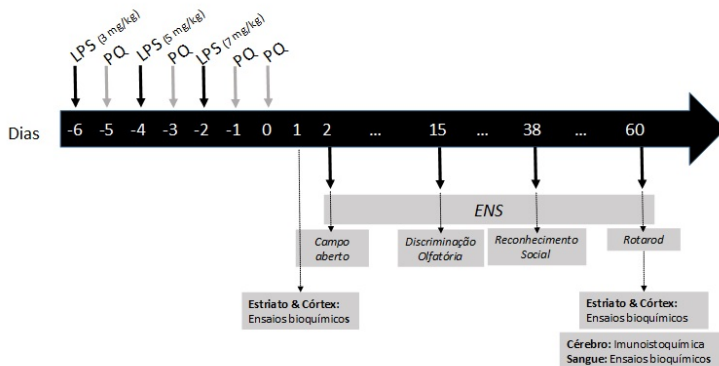


Figura 5. Linha do tempo descritiva protocolo experimental III: exposição sistêmica ao LPS e PQ em camundongos. Camundongos machos adultos foram expostos ao LPS (3, 5 e 7 mg/kg, i.p.) nos dias 1, 3 e 5, respectivamente, e ao PQ (5 mg/kg) nos dias -5, -3, -1 e 0. Os animais do grupo controle receberam solução salina nos 7 dias de injeções. Nos dias 2, 15, 30 e 60 após a última administração de PQ ou salina (dia zero) foram realizados o teste comportamental ENS; também foram realizados os testes de campo aberto (dia 2), discriminação olfatória (dia 15), reconhecimento social (dia 38) e *rotarod* (dia 60). Nos dias 1 e 60 pós-tratamento, dois grandes grupos (contendo os 4 grupos de análise: controle, LPS, PQ e LPS + PQ, n = 6) foram eutanasiados e o estriado e córtex cerebral isolados para análise bioquímicas. Um terceiro grupo de animais (controle, LPS, PQ e LPS + PQ, n = 6) foi eutanasiado 60 dias pós-tratamento, o cérebro foi retirado e fixado para análise imunistoquímica e o sangue coletado para análise bioquímica plasmática.

4.1.6 Análises Comportamentais

4.1.6.1 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para investigar a atividade locomotora e o comportamento exploratório dos animais. Para as análises no “*Protocolo experimental II*” os camundongos foram colocados individualmente no centro de uma arena circular (44 cm de diâmetro e 22 cm de altura), com setores desenhados no chão. O número de cruzamentos (número de quadrantes cruzados pelo animal com as quatro patas) foi utilizado para avaliar a atividade locomotora, e o número de levantadas (número de vezes que os animais se equilibram sobre as patas traseiras) para avaliar o comportamento exploratório, registrados em um período de

6 minutos. Para as análises no “*Protocolo experimental III*” foi utilizado um aparato de acrílico transparente com assoalho cinza medindo 50 x 50 x 50 cm. O assoalho é virtualmente dividido em 16 quadrantes (4 centrais e 12 periféricos). Cada camundongo foi colocado no centro da arena e a distância percorrida e a velocidade média foram registradas por 5 minutos. O aparato foi limpo com álcool etílico 10% após a avaliação de cada animal.

4.1.6.2 Teste do Rotarod

O teste do *rotarod* é utilizado para avaliar a integridade do sistema motor dos animais e foi utilizado para as análises no “*Protocolo experimental II e III*”. O aparato é composto por uma barra giratória de 30 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, a qual possui 4 compartimentos individualizados, que permite a avaliação simultânea de 4 animais. O protocolo adotado foi o de aceleração, onde os animais eram colocados sobre a barra numa velocidade inicial de 5 rotações por minuto (rpm), ao longo do período de 6 minutos de avaliação onde a velocidade aumenta progressivamente até no máximo 25 rpm. O tempo de latência para a primeira queda e o número de quedas de cada animal foi registrado.

4.1.6.3 Avaliação do Escore Neurológico de Severidade (ENS)

Este teste consiste em uma escala composta de tarefas projetadas para medir o estado neurológico geral de roedores (FLIERL *et al.*, 2009; SCHWARZBOLD *et al.*, 2010). Os animais submetidos ao “*Protocolo experimental III*” foram avaliados no ENS através dos parâmetros apresentados na Tabela 1 realizados em um aparato como mostrado na Figura 6. A falha em algum destes parâmetros corresponde ao valor 1 e o sucesso a 0 (zero). Valores mais altos no ENS indicam um maior comprometimento neurológico do animal (SCHWARZBOLD *et al.*, 2010). Detalhes do aparato utilizado e da tabela de avaliação podem ser visualizados na figura 6.

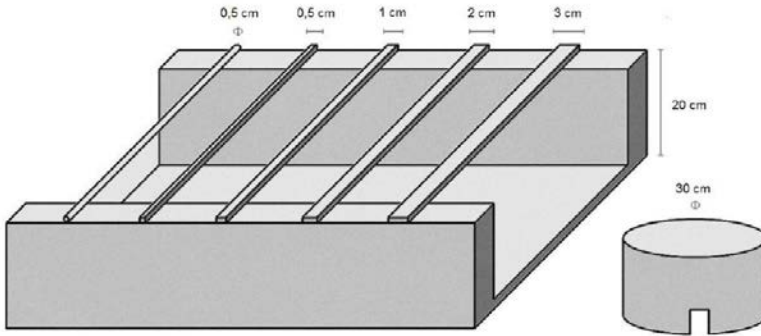


Figura 6. Equipamento utilizado para avaliação do Escore Neurológico de Severidade de camundongos (SCHWARZBOLD *et al.*, 2010).

Tabela 1: Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de Severidade (ENS)

- | | |
|-----|---|
| 1. | Presença de paresia |
| 2. | Inabilidade de andar em linha reta |
| 3. | Perda do comportamento exploratório |
| 4. | Falha em sair do círculo (até 3 min) |
| 5. | Inabilidade em andar na trave de 3 cm (até 2 min) |
| 6. | Inabilidade em andar na trave de 2 cm (até 2 min) |
| 7. | Inabilidade em andar na trave de 1 cm (até 2 min) |
| 8. | Inabilidade em se equilibrar na trave 0,7 cm (até 10 s) |
| 9. | Inabilidade em se equilibrar na redonda 0,7 cm (até 10 s, 3 tentativas) |
| 10. | Perda do reflexo de sobressalto |

4.1.6.4 Discriminação olfatória

A habilidade de discriminação olfatória dos camundongos foi avaliada nos animais submetidos ao “*Protocolo experimental III*” conforme previamente descrita (CARR *et al.*, 1976). Este teste consiste em colocar o animal por 5 min em uma caixa, a qual é dividida em dois compartimentos idênticos separados por uma abertura, de modo que o animal poderá escolher ficar no compartimento com serragem nova

(ambiente não-familiar) ou com serragem “inalterada”, a mesma na qual os animais estavam acomodados 48 h antes do teste (ambiente familiar). O tempo gasto por cada camundongo em ambos os compartimentos (familiar *versus* não-familiar) foi registrado. Camundongos saudáveis são capazes de reconhecer e discriminar entre o compartimento familiar e o não-familiar, passando mais tempo no compartimento familiar, uma vez que preferem o ambiente com seu próprio odor.

4.1.6.5 Reconhecimento Social

A memória social de curto prazo foi avaliada pelo teste de reconhecimento social previamente descrita (DANTZER *et al.*, 1987) com algumas modificações (PREDIGER *et al.*, 2010). Os animais submetidos ao “*Protocolo experimental III*” foram individualizados em caixas (42 cm × 34 cm × 17 cm) por pelo menos 24 h de habituação no novo ambiente. Para a realização do teste, 6 camundongos *Swiss* jovens (um mês de idade) foram mantidos em uma gaiola à parte. Os animais jovens foram isolados em gaiolas por 20 minutos antes do início do experimento. A tarefa de reconhecimento social consiste em duas apresentações sucessivas (5 minutos cada), separadas por um curto período de tempo (30 minutos), onde o camundongo jovem foi colocado na gaiola do camundongo adulto e o tempo gasto pelos idosos em investigar o jovem foi registrado. No final da primeira apresentação, o jovem foi removido e mantido em uma gaiola individual durante o período de intervalo e reexposto ao camundongo adulto após 30 min. Normalmente, roedores adultos são capazes de reconhecer animais jovens familiares após este curto espaço de tempo, o que reflete numa diminuição no tempo de investigação.

4.1.7 Análise Bioquímica

4.1.7.1 Permeabilidade da BHE

A técnica que utiliza fluoresceína de sódio (NaFl, 376 Da) é amplamente utilizada para avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica a moléculas de baixo peso molecular (SHIMOJIMA *et al.*, 2008). Os camundongos submetidos ao “*Protocolo experimental I*” foram mantidos anestesiados com isoflurano enquanto recebiam uma injeção intravenosa (intrapeniana) de 4 mL/kg de 4% NaFl. Trinta minutos depois, os camundongos foram anestesiados com cetamina e

xilazina (75 e 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e perfundidos com solução salina. O cérebro foi removido e o estriado e córtex isolados. As estruturas foram homogeneizadas em ácido tricloroacético 7,5% e centrifugadas a $10.000 \times g$ por 10 minutos. O sobrenadante foi acrescido de tampão fosfato de potássio 1 M (1:1) e realizada a análise fluorimétrica do conteúdo de NaFl (460 nm excitação e 515 nm emissão, com a curva padrão). Uma curva de NaFl foi utilizada para calcular seus níveis nas amostras analisadas. Os dados foram expressos como ng/mg de tecido e corrigidos por porcentagem do controle.

4.1.7.2 Análise de parâmetros bioquímicos plasmáticos

Os níveis de colesterol total, glicose, triglicerídeos, ureia, creatinina, aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) foram determinados por um método enzimático utilizando kit comercial de reagentes (Labtest Diagnóstica ®, Lagoa Santa-MG, Brasil).

4.1.7.3 Preparação tecidual para as análises bioquímicas

Vinte e quatro horas ou 60 dias após a última administração (experimentos distintos conduzidos em paralelo) após as análises comportamentais, os animais submetidos aos “*Protocolos experimentais II e III*” foram eutanasiados por decapitação e o estriado e córtex cerebral foram coletados, e os hemisférios separados para as distintas análises. Para a determinação dos níveis de tióis não proteicos (NPSH), as amostras de estriado e córtex foram homogeneizadas em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e centrifugadas a $5.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. Para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase (GPx), glutathiona redutase (GR) e catalase (CAT), as amostras de estriado e córtex foram homogeneizadas em 10 volumes de tampão HEPES 20 mM, pH 7,0 e centrifugadas a $16.000 \times g$ a 4°C por 20 minutos e o sobrenadante gerado foi utilizado para a dosagem da atividade enzimática. Para avaliar a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, as amostras foram homogeneizadas em 10 volumes de tampão fosfato (pH 7,4), contendo 0,3 M de sacarose, 5 mM de MOPS, 1 mM de EGTA e 0,1% de albumina e centrifugadas a $1000 \times g$ a 4°C durante 10 minutos.

As amostras destinadas às análises de *western blot* (protocolo II e III) e *dot blot* (protocolo III) foram homogeneizadas em tampão de extração (Tris 50 mM pH 7,0, EDTA 1 mM, NaF 100 mM, PMSF 0,1

mM, Na₃VO₄ 2 mM, Triton X-100 1%, glicerol 10% e coquetel de inibidores de proteases). Em seguida, foram centrifugadas (10.000 x g por 10 min, a 4°C) com o intuito de eliminar os fragmentos celulares (uma alíquota foi separada para dosagem de proteína). Os sobrenadantes foram diluídos na proporção de 1/1 (v/v) em solução de Tris 100 mM (pH 6,8), EDTA 4mM e SDS 8%, e aquecidos a 100°C por 5 min. Foram adicionados nas amostras tampão de diluição (40% glicerol, 100 mM Tris, azul de bromofenol, pH 6,8) na proporção 1:4 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%).

4.1.7.4 Atividade de GPx e GR

A atividade da GPx foi determinada pelo método descrito por Wendel, o qual utiliza peróxido de terc-butila como substrato (WENDEL, 1981). A GPx catalisa a redução de H₂O₂, e outros peróxidos orgânicos, utilizando a GSH como co-substrato e produzindo glutationa oxidada (GSSG). Por sua vez, a GSSG é reduzida pela GR com o consumo de nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato reduzido (NADPH), que foi medido através da leitura em espectrofotômetro em 340 nm. A atividade da GR foi determinada através do método descrito por Carlberg e Mannervik (CARLBERG e MANNERVIK, 1985). A taxa de redução da GSSG foi determinada indiretamente através do monitoramento do consumo (oxidação) do NADPH a 340 nm. A atividade da GPx e da GR foram expressas em nmol de NADPH oxidado/min/mg de proteína.

4.1.7.5 Atividade da catalase

A atividade da CAT foi determinada pelo método de Aebi (AEBI *et al.*, 1974). A reação foi iniciada pela adição de 300 mM de H₂O₂ e a taxa de consumo do peróxido foi registrada espectrofotometricamente a 240 nm. Os dados foram expressos em μmol H₂O₂ consumido/min/mg de proteína.

4.1.7.6 Determinação do conteúdo de tióis não proteicos

O conteúdo de tióis não proteicos (NPSH) foi avaliado através do método previamente descrito (ELLMAN, 1959), que determina principalmente glutationa reduzida (GSH). As amostras foram precipitadas em ácido tricloroacético (TCA) 10% gelado e centrifugadas a 5.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi incubado com DTNB 10

mM em tampão fosfato 1 M pH 7,0. Posteriormente, as absorbâncias foram mensuradas em 412 nm e uma curva de glutatona reduzida foi utilizada para calcular os níveis de NPSH. Os dados foram expressos em nmol de NPSH/mg de proteína.

4.1.7.7 Atividade dos complexo I (NADH desidrogenase) e complexo II da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I (NADH desidrogenases) foi determinada através da taxa de redução do ferricianeto dependente de NADH (420 nm), como descrito previamente por Cassina e Radi (CASSINA; RADI, 1996). A atividade do complexo II (succinato-2,6-dicloroindofenol (DCIP)-oxidoreductase) foi determinada segundo Fischer e colaboradores (FISCHER *et al.*, 1985). Os métodos descritos foram realizados seguindo as modificações de Latini e colaboradores (LATINI *et al.*, 2005). As atividades dos complexos da cadeia respiratória foram calculadas como nmol/min/mg proteína.

4.1.7.8 Western Blot

As amostras de estriado (15 µg de proteína) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS poliacrilamida (PAGE), utilizando géis a 12%, e após a separação eletroforética as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm de diâmetro). Após a transferência, as membranas foram bloqueadas (1 h) com 5% de leite desnatado em TBS tween 0,05% (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) e incubadas *overnight* a 4° C, com os anticorpos anti-TH (1/2000; 62kDa) e anti-β-actina (1:3000; 43kDa), diluídos em tampão TBS-Tween-BSA (Tris base 20 mM, NaCl 140 mM, Tween-20 0,05%, albumina 0,02%). Após 3 lavagens (10 min cada), as membranas foram incubadas durante 60 min à temperatura ambiente com os anticorpos secundários IgG conjugados com peroxidase: anti-camundongo (TH ou β-actina). A ligação específica do anticorpo foi revelada utilizando um kit quimioluminescente (sistema Perkin Elmer ECL). Finalmente, as bandas foram analisadas quanto a densidade óptica utilizando-se o software Image Lab (*Bio-Rad Laboratories*, USA) e os valores densitométricos das bandas foram normalizados em relação as bandas de β-actina. Os resultados da análise estatística foram convertidos em valores percentuais em relação ao grupo controle (considerado 100%).

4.1.7.9 Dot Blot

A análise de dot plot foi realizada aplicando 4 µg de proteína numa membrana de PVDF. As membranas foram bloqueadas durante 1 h com uma solução de leite desnatado a 5% em tampão tris-salina com tween 20 (TBS-T) e lavada 3 vezes. Em seguida, as membranas foram incubadas de um dia para o outro a 4 °C com anticorpos anti-3-nitrotirosina (3-NT) (1: 3000) ou anti-malondialdeído (MDA) (1: 4000, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, ou anticorpo anti-4-hidroxi-2-noneal (4-HNE) (1: 3000; Abcam, Cambridge, UK) e a intensidade da banda foi normalizada por coloração com Ponceau.

As membranas foram expostas a anticorpos secundários conjugados com peroxidase e visualizadas utilizando um kit de detecção quimioluminescência melhorada (ECL, *Enhanced chemiluminescence*.) (GE Healthcare, Little Chalfont, RU). A análise densitométrica foi realizada utilizando o software Image J (NIH, EUA). O nível de expressão foi determinado como a proporção da densidade óptica da banda de proteína de interesse sobre a coloração de Ponceau.

4.1.7.10 Dosagem de proteínas

O conteúdo de proteínas foi quantificado pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), usando albumina de soro bovino para curva padrão.

4.1.8 Análises de imunoistoquímica

Os camundongos submetidos ao “*Protocolo experimental III*” foram anestesiados cetamina e xilazina (75 and 10 mg/kg, respectivamente, i.p.) e perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com solução salina, seguida por uma solução fixadora de paraformaldeído 4% em 0,1 M de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Após a perfusão, os cérebros foram removidos e mantidos em paraformaldeído 4%. Após 4-6 h, esta solução foi trocada por uma de sacarose 30% em PBS e mantidos a 4°C. Cortes coronais em série (30 µM) de estriado e SN foram obtidos através do vibrátomo (Vibratome®, *Series 1000*) a fresco. Primeiramente, os cortes foram incubados em uma solução de 0,3 % de H₂O₂ em PBS contendo 0,15 % de triton X-100 (PBS-T), por 30 minutos, para inibição das peroxidases endógenas. Em seguida, foi realizado o bloqueio para evitar marcações inespecíficas utilizando

5% de soro de cabra ou coelho em PBS-T por 40 min à temperatura ambiente. Posteriormente, as secções foram incubadas overnight a 4 °C com o anticorpo primário anti-TH (1:500, US Biological, MA, USA). Após três lavagens em PBS-T, as secções de tecido foram incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-coelho diluídos 1:250 em PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram incubadas por 1 hora com o complexo biotina-estreptavidina (VECTASTAIN®, 1:125), seguido da reação de revelação com 0,035 % de cloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich). As secções foram montadas em lâminas tratadas com gelatina e cobertas com lamínulas utilizando o meio de montagem Entellan (Merck) para posterior observação microscópica. A quantificação foi realizada por densidade óptica utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.2 Estudos *in vitro*

4.2.1 Animais

Os estudos *in vitro* foram realizados no Departamento de Anatomia e Biologia Celular do Instituto Stark de Pesquisa em Neurociências, Indianápolis, Estados Unidos. Para os estudos com cultivo primário mesencefálico, foram utilizadas ratas prenhas *Sprague Dawley* no dia gestacional (DG) 14 (n=30). Os animais foram obtidos do laboratório Jackson (Bar Harbor, Maine) no DG 12 e mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura controlada de 20,5 – 22,5 °C e ciclo claro/escuro 12:12 horas (6:00 - 18:00 horas). Todos os procedimentos foram realizados em acordo com as normas e regulação do *National Institutes of Health* (NIH).

4.2.2 Cultivo mesencefálico primário de neurônio-glia

Os cultivos mesencefálico de neurônio-glia de rato foram preparados como descrito previamente (LIU *et al.*, 2001). Resumidamente, os tecidos do mesencéfalo dos embriões foram dissecados no dia gestacional 14. As células foram dissociadas através de trituração mecânica suave em meio essencial mínimo (MEM) e imediatamente semeadas (5×10^5 /poço) em placas de 24 poços revestidas com poli D-lisina (20 µg/mL). Três dias após a semeadura, as células

foram reabastecidas com 500 μL de meio de manutenção fresco. As culturas foram tratadas 7 dias após a semeadura.

4.2.3 Cultivo primário de micróglia

Os cultivos primários de micróglia foram preparados a partir de cérebros inteiros de um a dois camundongos de 1 dia de vida. Após a decapitação, cérebros inteiros foram retirados, as meninges e vasos sanguíneos removidos e o tecido cerebral triturado. As células (5×10^7) foram semeadas em meio completo (DMEM contendo 10% de soro bovino fetal, penicilina (50 U/mL), estreptomicina (50 mg/mL), L-glutamina (2 mM), aminoácidos não-essenciais (100 μM) e piruvato de sódio (1 mM), pH 7,2), em frascos de cultura de 175 cm^2 pré-revestidos com poli-D-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). O meio de cultura foi alterado 24 horas e 7 dias após a semeadura. Depois de 14 dias, uma monocamada confluyente de uma mistura de células gliais é formada e acima desta uma camada de micróglia ligeiramente aderida aos astrócitos. As culturas de micróglia essencialmente foram então obtidas a partir de agitação para desprendimento da micróglia levemente aderente, e semeando as células em placas de 24 poços para ensaios subsequentes. Após vinte e quatro horas, as células foram tratadas e as amostras coletadas.

4.2.4 Cultivo de células microgliais BV-2

A linhagem de células microgliais BV-2 foram mantidas a 37°C em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 U/mL de penicilina e 50 g/mL de estreptomicina numa incubadora umidificada com 5% de CO_2 /95% ar. Apenas as passagens 3-8 foram usadas para o estudo.

4.2.5 Cultivo de células astrocitárias C6

As células C6 (linhagem celular de astrócitos) foram mantidas em meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10%, acrescido de 50 U/mL de penicilina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e mantidas em incubadora umidificada a 37 °C e 5 % de CO_2 . Foram utilizadas para o estudo somente células entre as passagens 3 e 7.

4.2.6 Tratamento *in vitro*

Para investigar o possível efeito sensibilizante (*priming*) do herbicida PQ em cultivos de células microgliais e astrocitárias seguido da exposição ao um agente inflamatório (LPS) utilizamos diferentes tipos de cultivos para avaliar suas respostas particulares: cultivo primário de micróglia (CPM), cultivo primário mesencefálico de neurônio-glia (CPN-G), assim como as linhagens de células microgliais BV-2 e células astrocitárias C6, ambas imortalizadas a partir de ratos. As células foram cultivadas em placas de 24 ou 96 poços, dependendo da necessidade experimental.

Os cultivos primários de micróglia foram pré-tratados com PQ 0,5 μM e 30 min depois com LPS 5 ng/mL. Após três ou 24 horas, foram coletadas alíquotas do meio de cultivo e realizadas análises de marcadores inflamatórios; também avaliou-se a viabilidade celular. Os cultivos microgliais de células BV-2 foram pré-tratados com PQ 0,5 μM e 30 min depois com LPS 1 ng/mL, 2,5 ng/mL ou 5 ng/mL. Vinte e quatro horas após, foram coletadas amostras do meio e realizadas análises de nitrito e viabilidade celular. Os cultivos mesencefálicos de neurônio-glia foram pré-tratados com PQ 0,5 μM e 30 min depois com 2,5 ng/mL. Três ou 24 horas após o tratamento com LPS, foram coletadas amostras do meio e realizadas análises de marcadores inflamatórios. Algumas placas foram fixadas (9h pós tratamento) com formaldeído 3,5% para as análise de ativação microglial por imunocitoquímica (ICQ) e outras foram mantidas por 6 dias após o tratamento para determinação de captação de dopamina e análise de TH (ICQ). Os cultivos astrocitários de células C6 foram pré-tratados com PQ 1 μM e 30 min depois com LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) + TNF- α (60 ng/mL). Vinte e quatro horas após foram coletadas amostras do meio e realizadas análises de nitrito.

Todas as soluções de PQ e LPS foram preparadas a partir de soluções estoque congeladas (-20 °C) de 100 mM e 2,5 ng/mL, respectivamente. As concentrações utilizadas nos tratamentos eram ajustadas diluindo a solução estoque em meio de cultura adequado ao tipo celular (SFB 2%).

4.2.7 Ensaio de níveis de nitrito

Como medida indireta da produção de óxido nítrico (ON), a quantidade de nitritos no sobrenadante da cultura foi determinada com um ensaio colorimétrico utilizando reagente de Griess (Sulfanilamida 1%,

H₃PO₄ 2,5%, dicloridrato de N- (1-naftil) etilenodiamina 0,1%). Resumidamente, as células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas com ou sem LPS durante 24 horas. No final do período de incubação, os sobrenadantes dos cultivos foram coletados e misturados ao mesmo volume de reagente de Griess, imediatamente foram incubados no escuro durante 10 minutos e mediu-se a absorbância (540 nm) com um leitor de microplacas cinético UV MAX (Molecular Dispositivos, Sunnyvale, CA, EUA). As concentrações absolutas de nitrito foram determinados a partir de uma solução de nitrito padrão. O limite inferior de detecção do ensaio foi de aproximadamente 1,5 µM.

4.2.8 Ensaio de viabilidade celular

Foi utilizado o método colorimétrico 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium (MTT) descrito por Mosmann (MOSMANN, 1983) que consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. A quantificação foi medida através da leitura a 550 nm.

4.2.9 Concentração de TNF-α

Após o período de incubação (3 ou 24 horas) com LPS e PQ, a produção e liberação de TNF-α pelos cultivos celulares foi medido através do kit de imuno-absorção enzimática (ELISA) comercialmente vendido pela R&D Systems (Minneapolis, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante. A absorbância (450 nm) foi medida em um leitor de microplaca UV MAX (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA), utilizando o comprimento de onda de correção a 570 nm.

4.2.10 Captação de dopamina

O ensaio de captação de dopamina foi realizado nos cultivos primários mesencefálicos de nerônio-glia, 6 dias após o tratamento. As células foram incubadas em tampão Krebs-ringer (NaHPO₄ 16 mM, NaH₂PO₄ 16 mM, MgSO₄ 1,2 mM, EDTA 1,3 mM, KCl 4,7 mM) por 15 minutos a 37°C com [³H] dopamina 1 µM. A captação inespecífica de dopamina foi bloqueada com mazindol 10 µM. Após incubação, células foram lavadas 3 vezes com tampão Krebs-ringer frio (1 mL/poço). As células foram então lisadas com 0,5 mL/poço de NaOH 1 N e misturadas com 15 mL de fluido de cintilação. A radioatividade foi medida em

contador de cintilação, onde a captura específica de [³H] dopamina foi calculada subtraindo-se os valores dos poços sem inibidor por aqueles com inibidor (mazindol).

4.2.11 Imunocitoquímica

Neurônios dopaminérgicos foram identificados utilizando anticorpo policlonal de coelho anti-tirosina hidroxilase (TH, 1:1000) (Millipore Billerica, MA). Micróglia ativada foi identificada utilizando o anticorpo policlonal de coelho anti-molécula adaptadora da ligação com cálcio ionizado-1 (Iba-1, 1:1000) (Wako, Richmond, VA). Em placas de 24 poços, as células foram tratadas com H₂O₂ 1%, lavadas 2 vezes com tampão fosfato salino (PBS), seguido de incubação por 20 min com solução bloqueadora contendo albumina de soro bovino 1%, soro de cabra 4% e Triton X-100 0,4% diluídos em PBS. Finalmente, as células foram incubadas de um dia para o outro a 4°C com anticorpo primário preparado em diluente DAKO. As células foram então lavadas 2 vezes com PBS e incubadas com anticorpo anti-coelho biotilado (Vector Laboratories, Burlingame, CA) por 1 h, lavadas 2 vezes com PBS, e incubadas com reagentes Vectastain ABC Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA). A coloração foi visualizada utilizando comprimidos de 3,3'-diaminobenzidina e uréia (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). As imagens foram capturadas utilizando microscópio Olympus BX51 (Olympus America, Center Valley, PA).

4.3 Análise Estatística

Os dados foram primeiramente avaliados quanto a presença de *outliers* pelo teste de Grubbs e testados quanto a normalidade da distribuição pelo teste de Kolmogorov–Smirnov. A análise estatística foi realizada pelo software STATISTICA versão 8.0 (StatSoft, Inc., 2008). Diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste T de Student ou da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (com medidas repetidas, quando indicado), seguida pelo teste *post hoc* de Newman-Keuls. Os dados comportamentais que não apresentaram distribuição normal foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn. Os dados *in vitro* foram analisados através do software SPSS e a diferença entre grupos verificada através da ANOVA de duas vias, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni. Todos os dados foram expressos como média ± E.P.M., onde as diferenças foram

consideradas significativas quando $p < 0,05$. Todos os gráficos foram construídos utilizando-se o software GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 CAPITULO I: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ em camundongos

5.1.1 Protocolo experimental I: Efeito da administração de diferentes doses de LPS sobre a permeabilidade da BHE

Vinte e quatro horas após uma única exposição ao LPS (3 mg/kg) ou salina (dia experimental 2), foi possível verificar um aumento significativo ($p < 0,001$) no conteúdo de NaFl no estriado e no córtex dos animais tratados com LPS quando comparados ao animais do grupo controle (Figura 7). No dia experimental 3, os animais receberam a segunda dose de LPS (5 mg/kg) ou salina e, no dia experimental 4, houve um aumento significativo no conteúdo de NaFl no estriado ($p < 0,001$) e no córtex ($p < 0,01$) dos animais tratados com LPS quando comparados ao animais do grupo controle. No dia experimental 5, os animais receberam a terceira dose de LPS (7 mg/kg) ou salina e, no dia experimental 6, foi possível observar um aumento significativo ($p < 0,01$) do conteúdo de NaFl no estriado e no córtex dos animais tratados com LPS quando comparados ao animais do grupo controle. No dia experimental 8, também foi verificado um aumento significativo ($p < 0,01$) no conteúdo de NaFl em ambas as estruturas dos animais tratados com LPS quando comparados ao animais do grupo controle. Enfim, no dia experimental 11 houve um aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo de NaFl apenas no estriado no conteúdo de NaFl. Nos dias experimentais 15 e 22, não houve alterações significativas nos níveis de NaFl nas estruturas testadas. O efeito do LPS na permeabilidade da BHE pode ser claramente observado na Figura 8, onde fica evidente o aumento mais pronunciado no dia experimental 4, especialmente no estriado.

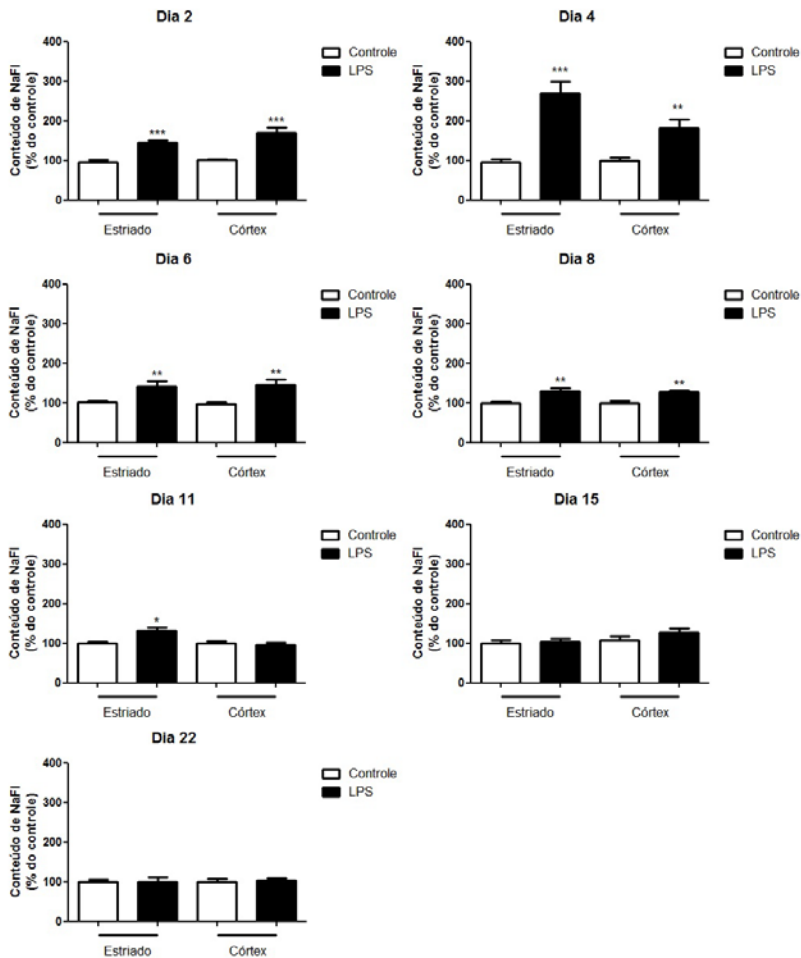


Figura 7. LPS aumenta a permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) em camundongos. Curso temporal do extravasamento de fluoresceína de sódio (NaFl) (administrada por via intravenosa, 4 mg/kg) no córtex e estriado de camundongos 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após uma, duas ou três injeções intraperitoneais de LPS (3, 5 e 7mg/kg) ou veículo (soro fisiológico), medido por fluorimetria (n = 5-8 animais/grupo). Os dados são apresentados como ng de NaFl/mg de tecido cerebral e corrigidos como porcentagem do controle (n = 8-10 animais/grupo). *p< 0,05, **p< 0,01, ***p< 0,001 quando comparado com o grupo de controle, por teste T não-pareado (controle x LPS).

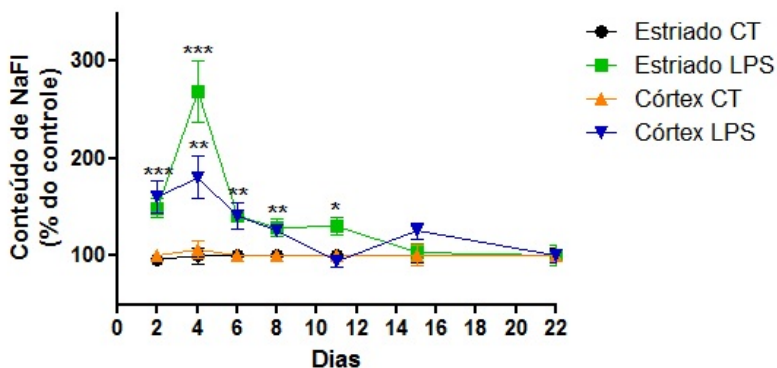


Figura 8. Linha de tendência: LPS aumenta a permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE) em camundongos. Curso temporal do extravasamento de fluoresceína de sódio (NaFl) (administrada por via intravenosa, 4 mg/kg) no córtex e estriado de camundongos 1, 3, 5, 7, 10, 14 e 21 dias após uma, duas ou três injeções intraperitoneais de LPS (3, 5 e 7mg/kg) ou veículo (soro fisiológico), medido por fluorimetria ($n = 5-8$ animais/grupo). Os dados são apresentados como ng de NaFl/mg de tecido cerebral e corrigidos como porcentagem do controle ($n = 8-10$ animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo de controle, por teste T não-pareado (controle x LPS).

5.1.2 Protocolo experimental II: Efeito da administração de diferentes doses de PQ – padronização da dose de PQ

Com o objetivo de encontrar uma dose de PQ adequada para a administração associada ao LPS, foi necessário realizar uma curva de dose do herbicida. Isto porque a dose de 10 mg/kg – amplamente utilizada na literatura nos modelos animais com PQ e maneb (AHMAD *et al.*, 2008) – a primeira a ser testada, promoveu um alto índice de mortalidade quando associada ao LPS (82%) (Figura 9). Por esta razão, neste segundo momento, os animais foram divididos em 5 grupos: i) controle (salina 10 mL/kg); ii) LPS + 1 mg/kg de PQ; iii) LPS + 3 mg/kg de PQ; iv) LPS + 5 mg/kg de PQ e; v) LPS + 7 mg/kg de PQ. Os animais do grupo LPS + 7 mg/kg de PQ apresentaram um alto índice de mortalidade (78%) e não foi possível obter um n amostral mínimo para fazer as análises comportamentais e bioquímicas (Figura 10).

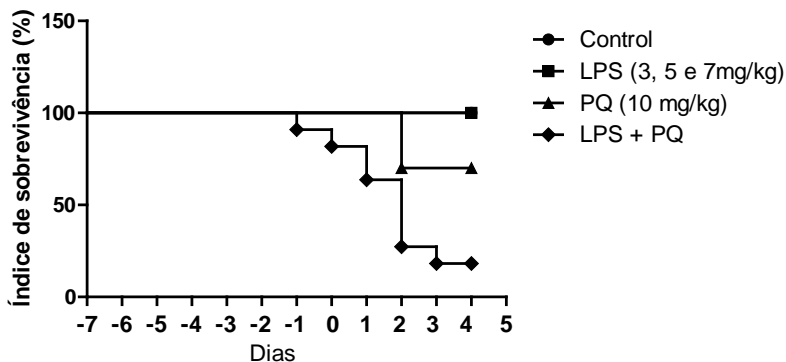


Figura 9. Índice de sobrevivência de camundongos submetidos à administração sistêmica de LPS e PQ (10 mg/kg). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg) e/ou PQ (10 mg/kg), ou veículo (salina 0,9%), uma vez ao dia durante 7 dias. No gráfico, o dia -6 corresponde ao dia da primeira injeção de LPS e dia zero corresponde ao dia da última injeção de PQ; (n inicial = 7 animais/grupo).

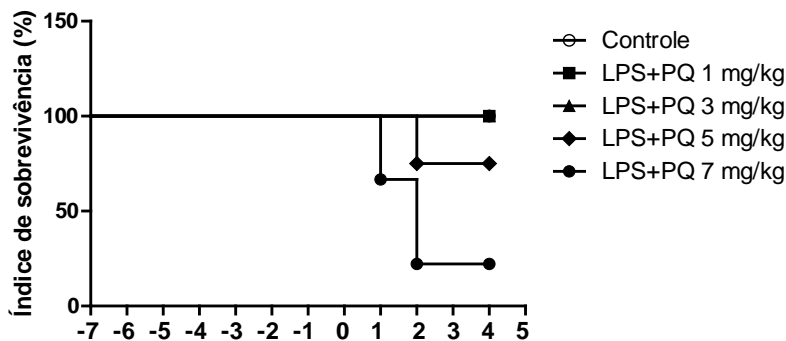


Figura 10. Índice de sobrevivência de camundongos submetidos à administração sistêmica de LPS e diferentes doses de PQ (1, 3, 5, ou 7 mg/kg). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg) e PQ (1, 3, 5, ou 7 mg/kg), ou veículo (salina 0,9%), uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 2). No gráfico, o dia -6 corresponde ao dia da primeira injeção de LPS e dia zero corresponde ao dia da última injeção de PQ; (n inicial = 8 animais/grupo).

O peso corporal dos animais foi monitorado um dia antes das administrações de LPS e PQ e periodicamente ao longo dos 30 dias de avaliação. Os animais tratados com LPS (3, 5 e 7 mg/kg) e PQ nas concentrações de 1, 3 e 5 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso corporal no dia experimental -2, dia em que foi administrado a terceira injeção de LPS (Figura 11). Nos grupos LPS + PQ 3 mg/kg e LPS + PQ 5 mg/kg, o peso permaneceu menor que o do grupo controle até o final do experimento (dia experimental 29). O grupo LPS + PQ 1 mg/kg recuperou o peso corporal a partir do dia experimental 20, não havendo mais diferenças significativas na média do peso corporal, quando comparado ao grupo controle.

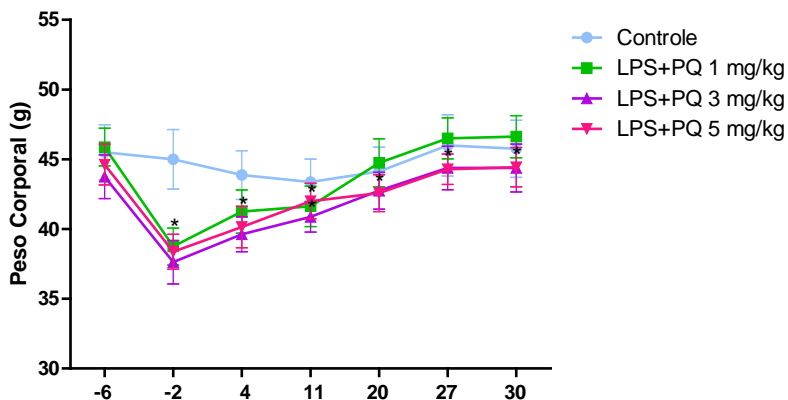


Figura 11. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) no peso corporal de camundongos. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (1, 3, 5 ou 7 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 2). O dia -6 corresponde ao dia da primeira injeção de LPS e dia zero corresponde ao dia da última injeção de PQ ($n = 7-8$ animais/grupo). Os dados são representados como média \pm E.P.M. Análise estatística através de ANOVA de uma via, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

A atividade locomotora espontânea foi avaliada ao longo do experimento através do teste do campo aberto nos dias experimentais 1, 9, 15 e 22. No dia experimental 1 (24 h após a última administração do PQ), houve uma diminuição significativa no número de cruzamentos nos três grupos teste: LPS + PQ 1 mg/kg, LPS + PQ 3 mg/kg e LPS + PQ 5 mg/kg (Figura 12A). Além disso, também foi observada uma diminuição

significativa no número de cruzamentos no dia experimental 15 no grupo LPS + PQ 1 mg/kg. Não foi verificada nenhuma diferença significativa nos dias experimentais 9 e 22.

Um perfil muito semelhante foi observado no comportamento exploratório. Novamente, no dia experimental 1, os três grupos teste (LPS + PQ 1 mg/kg, LPS + PQ 3 mg/kg e LPS + PQ 5 mg/kg) apresentaram uma diminuição significativa no número de levantadas (Figura 12B), assim como no dia experimental 15 somente os animais do grupo LPS + PQ 1 mg/kg apresentaram uma diminuição significativa no número de levantadas quando comparados ao grupo controle.

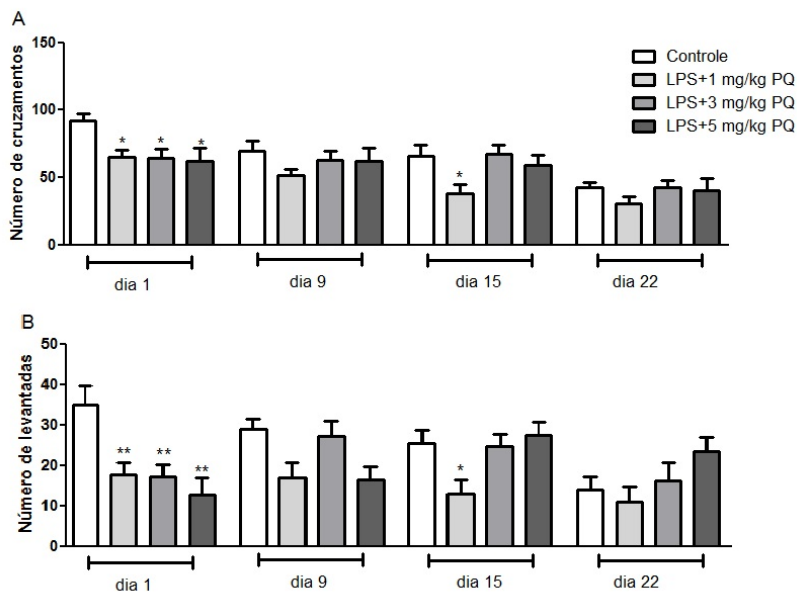


Figura 12. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) no atividade locomotora espontânea de camundongos. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 2). Dia -6 corresponde ao dia da primeira injeção de LPS e dia zero corresponde ao dia da última injeção de PQ. Teste de campo aberto foi realizado nos dia 1, 9 15 e 22 pós-tratamento (n = 7-8 animais/grupo). Os dados de número total de cruzamentos (A) e de levantadas (B) são representados como média \pm E.P.M. Análise estatística através de ANOVA de uma via, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Os mesmos animais foram submetidos também ao teste de *rotarod* nos mesmos dias, para avaliar a coordenação motora e equilíbrio. Não houve diferença significativa na latência para primeira queda (Figura 13A), assim como no número de quedas (Figura 13B) entre os grupos no mesmo período. No entanto, foi possível observar que ao longo das semanas (dias 9, 15 e 22) os animais apresentaram diminuição progressiva no número de quedas e um aumento no tempo de latência para primeira queda, indicando que os animais aprenderam e melhoraram seu desempenho no teste.

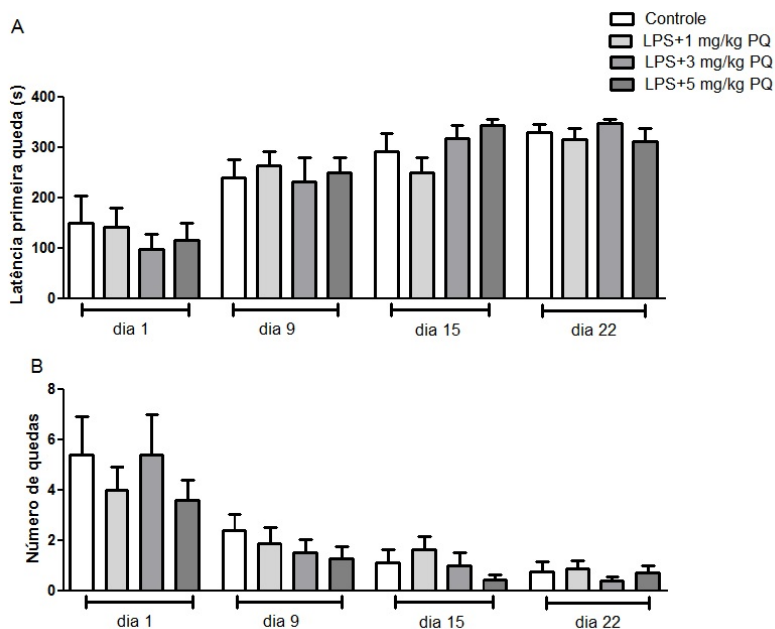


Figura 13. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) no desempenho motor na barra giratória (*rotarod*). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (1, 3, 5 ou 7 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 2). O teste rotarod foi realizado nos dias 1, 9, 15 e 22 pós-tratamento (n = 7-8 animais/grupo). Os dados de latência para a primeira queda (A) e de número total de quedas (B) são representados como média \pm E.P.M. Análise estatística através teste não-paramétrico Kruskal Wallis.

Vinte e dois dias após a última administração de PQ, os animais foram eutanasiados, o sangue e os estriados foram coletados. As amostras sanguíneas foram devidamente processadas para avaliação de perfil lipídico (glicose, colesterol e triglicerídeos), renal (ureia) e hepático (AST e ALT). A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos na análise plasmática. Observou-se um aumento significativo na concentração plasmática de glicose nos três grupos teste: LPS + PQ 1 mg/kg ($p < 0,01$), LPS + PQ 3 mg/kg ($p < 0,05$) e LPS + PQ 5 mg/kg ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Além disso, ocorreu um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de triglicerídeos no grupo LPS + PQ 1 mg/kg. Não houve alterações nas concentrações plasmáticas de colesterol, ureia, assim como nas atividades das enzimas AST e ALT.

Tabela 2: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) na análise plasmática de camundongos.

Grupos	Colesterol T.(mg/dL)	Triglic. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	AST (nmol/dL)	ALT (nmol/dL)
Controle	59,7 ± 4,4	57,6 ± 3,7	47,4 ± 7,1	30,7 ± 1,7	407,6 ± 16,3	159,4 ± 24
LPS+PQ 1	60,0 ± 4,5	84,7 ± 8,3*	89,2 ± 4,5**	30,9 ± 3,2	314,4 ± 23,9	173,1 ± 10,8
LPS+PQ 3	66,0 ± 5,0	74,7 ± 9,9	72,6 ± 8,7*	29,8 ± 0,9	370,1 ± 27,6	143,2 ± 18,9
LPS+PQ 5	60,8 ± 4,9	62,9 ± 2,1	75,6 ± 5,6*	34,5 ± 3,8	321,6 ± 11,6	199,7 ± 16,9

ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey

Os dados foram expressos pela média ± EPM

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle ($n = 7-8$).

A fim de observar possíveis alterações bioquímicas estriatais desencadeadas pelo LPS e as diferentes doses de PQ, analisou-se a atividade das enzimas GR e GPx, complexos mitocondriais I e II, bem como avaliação dos níveis de TH (*Western blott*) no estriado. Houve uma diminuição significativa na atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial ($p < 0,05$) no estriado dos animais que receberam LPS + PQ 3 mg/kg ($p < 0,01$) (Tabela 3). Não foi observada nenhuma alteração significativa na atividade das NADH desidrogenases (complexo I), bem como na atividade das enzimas antioxidantes GR e GPx no estriado dos animais que receberam LPS + PQ 1 mg/kg, LPS + PQ 3 mg/kg ou LPS + PQ 5 mg/kg. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas nos níveis de TH no estriado de camundongos 22 dias após à administração de LPS e PQ nas diferentes doses (Figura 14).

Tabela 3: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) na atividade dos complexos I (CI) e II (CII) da cadeia respiratória mitocondrial; glutatona redutase (GR) e glutatona peroxidase (GPx) no estriado de camundongos.

Grupos	CI	CII	GR	GPx
Controle	53,94 ± 2,22	5,35 ± 0,43	10,8 ± 0,94	5,05 ± 0,35
LPS+PQ 1 mg/kg	50,7 ± 2,28	5,09 ± 0,27	9,55 ± 0,62	4,38 ± 0,32
LPS+PQ 3 mg/kg	46,92 ± 3,46	4,10 ± 0,13*	11,96 ± 0,99	4,47 ± 0,38
LPS+PQ 5 mg/kg	57,3 ± 1,48	4,45 ± 0,63	11,5 ± 0,94	4,37 ± 0,26

Os dados foram expressos pela média ± erro padrão ($n = 7$). Análise estatística: ANOVA de uma via, seguido do teste de Tukey; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

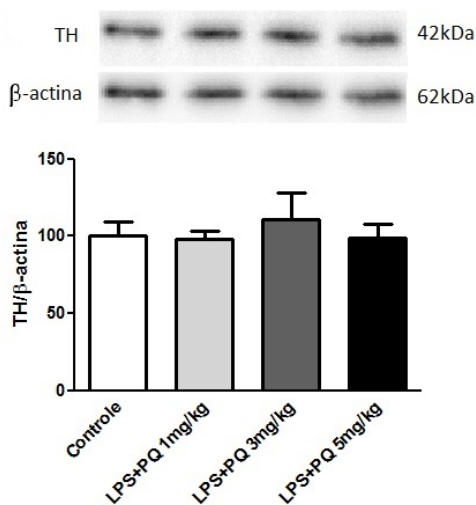


Figura 14. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ (1, 3 ou 5 mg/kg) nos níveis de TH no estriado de camundongos. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (1, 3, 5 ou 7 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 2). Os animais foram sacrificados 22 dias após a última administração de PQ. Os dados são expressos como média ± E.P.M. Análise estatística através de ANOVA de uma via, *post hoc* Newman-Keuls.

5.1.3 Protocolo experimental III: Efeito neurotóxicos da administração de LPS, PQ ou LPS + PQ

A terceira parte do projeto objetivou verificar e caracterizar os efeitos neurotóxicos (agudos e de longo prazo) da associação das administrações de LPS + PQ, com foco na toxicidade dopaminérgica sobre parâmetros bioquímicos e comportamentais no estriado e córtex de camundongos machos adultos. Os efeitos bioquímicos foram analisados em dois períodos: agudo (24 h após a última administração de PQ) e de longo prazo (60 dias após a última administração de PQ). As avaliações comportamentais foram realizadas em diversos períodos conforme descrito anteriormente (ver Figura 5).

5.1.3.1 Efeitos agudos da administração sistêmica de LPS, PQ ou LPS + PQ no peso corporal, parâmetros relacionados ao metabolismo energético mitocondrial e estresse oxidativo

O peso corporal dos animais foi verificado 1 hora antes da primeira administração de LPS (dia experimental -6) e acompanhado ao longo do período de até 60 dias após a última administração de PQ (Figura 15). O teste de ANOVA com medidas repetidas indicou que houve uma significativa interação entre o fator tempo e a administração de LPS [$F_{(9,387)} = 20,78$; $p < 0,001$]. De fato, houve uma significativa redução ($p < 0,05$) no peso corporal nos animais dos grupos que receberam LPS e LPS + PQ quando realizou-se a pesagem 24 h após a última administração de PQ (dia experimental 1). Uma semana após as administrações, já foi possível observar a recuperação do peso corporal (dia experimental 7). Na semana seguinte (dia experimental 14) verificou-se que a média dos pesos corporais dos grupos que receberam LPS (LPS e LPS + PQ) foram menores, mas não estatisticamente significantes, quando comparadas à média dos grupos controle e PQ. Ao longo dos dias analisados, não houve diferença significativa entre as médias do peso corporal dos diferentes grupos. Além disso, não foram registradas mortes ao longo do período experimental de 60 dias.

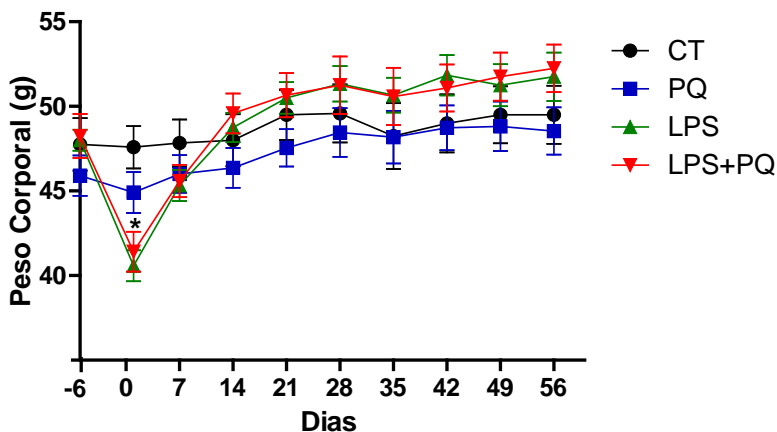


Figura 15. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no peso corporal de camundongos. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg) e/ou PQ (5 mg/kg), ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). O dia -6 corresponde ao dia da primeira injeção de LPS e dia zero corresponde ao dia da última injeção de PQ. Os dados estão expressos em gramas e são representados como média \pm E.P.M. Análise estatística através de ANOVA de medidas repetidas, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Vinte e quatro horas após o fim das injeções de PQ e/ou LPS, os animais foram eutanasiados por decapitação, o encefalo foi removido e o estriado e o córtex cerebral foram isolados para análise dos seguintes marcadores bioquímicos: complexo I e II da cadeia respiratória, GR, GPx, NPSH, e catalase.

Em virtude da forte relação apresentada na literatura entre a disfunção mitocondrial e a fisiopatologia de diversas doenças neurodegenerativas, foram avaliadas as atividades das NADH desidrogenases (complexo I) e complexo II da cadeia respiratória mitocondrial. Animais submetidos à administração sistêmica de LPS e/ou PQ não apresentaram alterações significativas na atividade do complexo I (Figura 16A) e complexo II (Figura 16C) no estriado. No entanto, o LPS causou um efeito significativo na atividade cortico-cerebral do complexo I [$F_{(1,22)} = 4,48$; $p = 0,04$]: animais que receberam apenas LPS apresentaram um aumento significativo ($p < 0,01$) na atividade do complexo I no córtex (Figura 16B) 24 h pós-tratamento.

Além disso, um efeito significativo de interação entre o PQ e LPS foi encontrado [$F_{(1,22)} = 11,73$; $p < 0,01$]. Não houve alterações significativas na atividade do complexo II no córtex (Figura 16D).

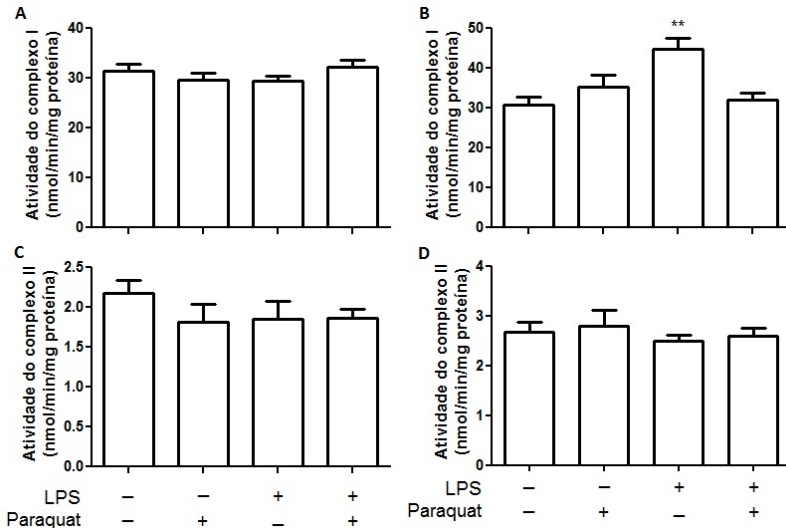


Figura 16. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade de NADH desidrogenases (complexo I) no estriado (A) e córtex (B) e atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 24 horas após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. ($n = 6-7$). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls; ** $p < 0,01$, quando comparado ao grupo controle.

Em relação à atividade das enzimas antioxidantes do sistema glutatona, a administração sistêmica de LPS e/ou PQ não promoveu alterações significativas na atividade das enzimas GR (Figura 17A,B) e GPx (Figura 17C,D), bem como nos níveis de NPSH (Figura 18A,B) no estriado e córtex cerebral de camundongos 24 horas pós-tratamento, quando comparado ao grupo controle.

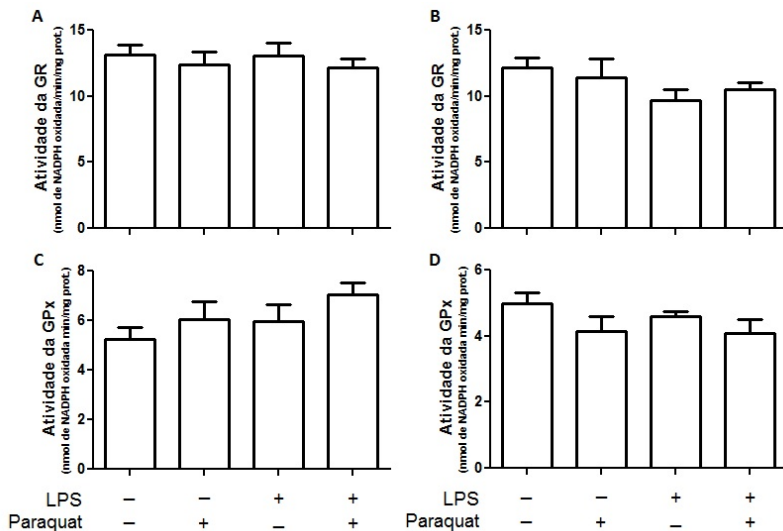


Figura 17. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade das enzimas glutatona redutase (GR) no estriado (A) e córtex (B) e glutatona peroxidase (GPx) no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 24 horas após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.

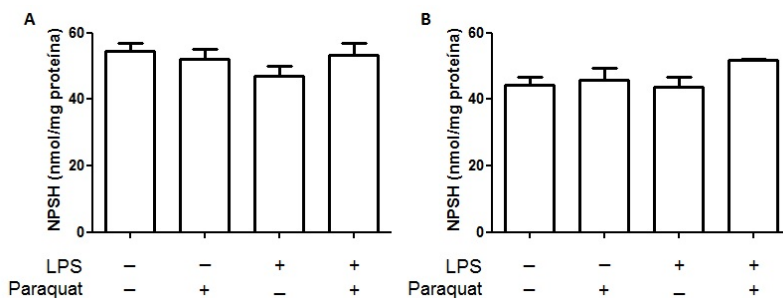


Figura 18. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis de grupos tióis não proteicos (NPSH) no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 24 horas após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo

(salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. ($n = 6-7$). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.

Outra importante enzima antioxidante é a catalase, que atua principalmente em condições onde há altas concentrações de H_2O_2 . Vinte e quatro horas após a administração sistêmica de LPS e/ou PQ, não foram registradas alterações significativas na atividade desta enzima no estriado de camundongos (Figura 19A). No entanto, o teste ANOVA de duas vias revelou um significativo efeito principal [$F_{(1,22)} = 14,11$; $p = 0,001$] do LPS sob a atividade da catalase no córtex. De fato, animais que receberam LPS e LPS + PQ apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na atividade da catalase no córtex (Figura 19B) quando comparado ao grupo controle. Entretanto, mas não houve interação significativa [$F_{(1,22)} = 0,57$; $p = 0,46$] dos fatores LPS e PQ.

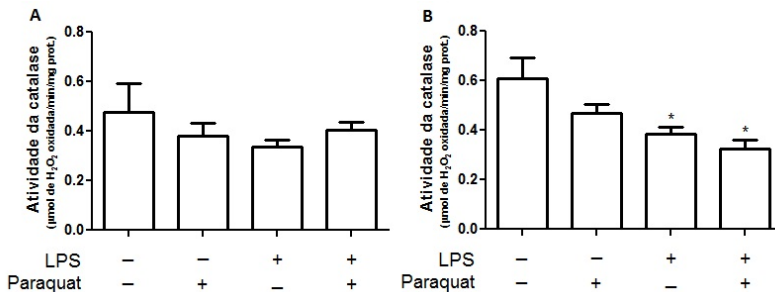


Figura 19. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade da enzima catalase no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 24 horas após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. ($n = 6-7$). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Outros parâmetros de estresse oxidativo foram analisados pela técnica de *dot blot*, que avalia de modo qualitativo a presença de biomoléculas de interesse. Para o presente estudo, investigou-se a presença de MDA e 4-HNE (aldeídos produtos da peroxidação lipídica) e 3-NT (produto da nitração de tirosina) como indicadores da ação dos radicais livres no organismo. Os dados obtidos estão apresentados na Figura 20, onde é possível observar que a exposição sistêmica ao LPS e

PQ não causaram alterações significativas nos níveis de MDA, 4-HNE e 3-NT no estriado de camundongos 24 horas após o tratamento, quando comparado ao controle.

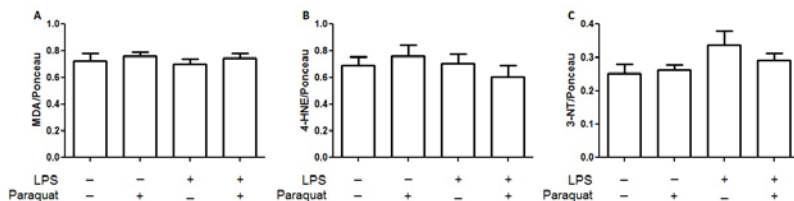


Figura 20. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis das enzimas malondialdeído (MDA)(A), 4-hidroxinonal (4-HNE) e 3-nitrotirosina (3-NT) no estriado de camundongos 24 horas após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.

5.1.3.2 Efeitos da administração sistêmica de LPS, PQ ou LPS + PQ no comportamento de camundongos

Tendo observado os efeitos bioquímicos agudos da administração de LPS, PQ ou LPS + PQ, a próxima etapa foi verificar os efeitos em longo prazo destas substâncias. Sendo assim, um novo grupo de animais foi submetido ao mesmo protocolo de administrações de LPS, PQ ou LPS + PQ. Sessenta dias após as injeções de PQ e/ou LPS, os animais foram anestesiados, o sangue coletado e em seguida eutanasiados por decapitação e o estriado e córtex isolados. Os parâmetros bioquímicos foram os mesmos analisados no experimento agudo, justamente para fins comparativos. No intuito de avançar no entendimento dos possíveis efeitos neurotóxicos destes insultos na via dopaminérgica, ainda foram realizadas análises de imunohistoquímica (TH em estriado e SN).

Entretanto, ao longo dos 60 dias (antes das análises bioquímicas e histoquímicas), os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais para observar possíveis alterações no sistema motor e não motor (olfatório e cognitivo). Além disso, foi utilizado o teste ENS para monitorar o estado neurológico geral dos animais. Para isso, o teste foi conduzido logo após o término das administrações sistêmicas de PQ

e/ou LPS, isto é, 2 dias após e repetido 15, 30 e 60 dias após o fim da injeções. Por tratar-se de um teste que abrange um conjunto de tarefas simples, a possibilidade de aprendizado com as repetições do teste são reduzidas.

A Figura 21 representa os dados obtidos no teste ENS nos 4 períodos analisados: 2, 15, 30 e 60 dias após a exposição ao LPS e/ou PQ. Segundo os parâmetros analisados neste teste, podemos concluir que o protocolo adotado de exposição sistêmica ao LPS e/ou PQ não causou comprometimento neurológico significativo ao longo dos 60 dias de observação.

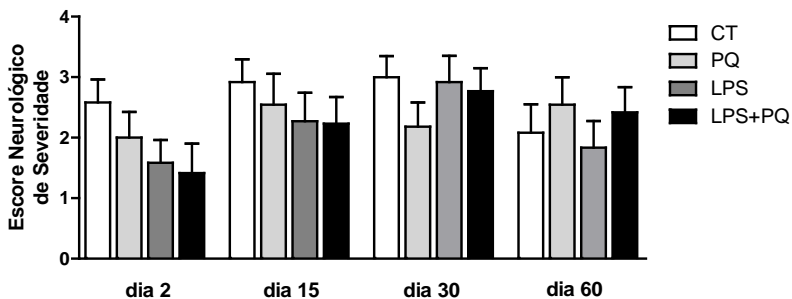


Figura 21. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste do escore neurológico de severidade (ENS) em camundongos adultos 2, 15, 30 e 60 dias após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 12). Análise estatística através teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

Além do teste ENS, no dia experimental 2 também foi realizado o teste de campo aberto, onde foram analisados parâmetros de locomoção como distância percorrida e velocidade média. Dois dias após a última administração de PQ, os animais que receberam LPS + PQ apresentaram uma tendência ($p = 0,08$) a um déficit locomotor devido a menor distância percorrida na arena (Figura 22 A). Ainda, o teste de ANOVA de duas vias revelou um efeito principal significativo atribuído ao LPS no parâmetro velocidade média [$F_{(1,41)} = 8,11$; $p < 0,01$]; houve uma diminuição significativa na velocidade média ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle (Figura 22 B). No entanto, não houve interação significativa entre os tratamentos de LPS e PQ [$F_{(1,41)} = 2,79$; $p = 0,10$].

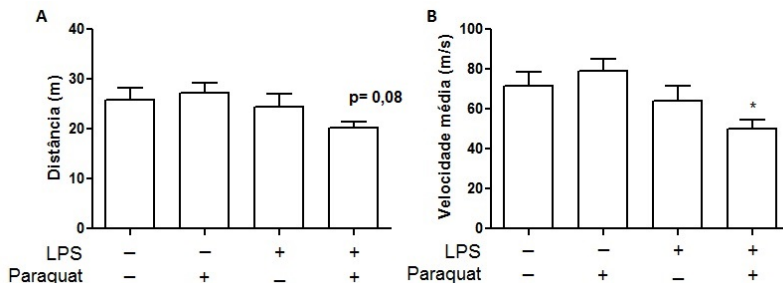


Figura 22. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste de campo aberto em camundongos adultos 2 dias após o tratamento.

Os dados de velocidade média (A) e distância percorrida (B) são expressos em metros e metros por segundo, respectivamente. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 10-12). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

A Figura 23 representa os dados obtidos no teste comportamental de discriminação olfatória realizado no dia experimental 15. Como esperado, os animais do grupo controle foram capazes de distinguir os dois ambientes (Figura 23A) de modo a permanecerem significativamente mais tempo no ambiente familiar ($p < 0,05$), quando comparado com o tempo no ambiente não familiar. O mesmo não aconteceu com os camundongos que receberam LPS, PQ ou LPS + PQ; não houve diferenças significativas entre o tempo gasto no ambiente familiar e no ambiente não familiar. O fato fica evidente quando se analisa somente a taxa de tempo gasto no ambiente familiar; animais que receberam LPS + PQ apresentaram um prejuízo olfatório evidenciado pelo menor tempo ($p < 0,05$) neste ambiente (Figura 23 B).

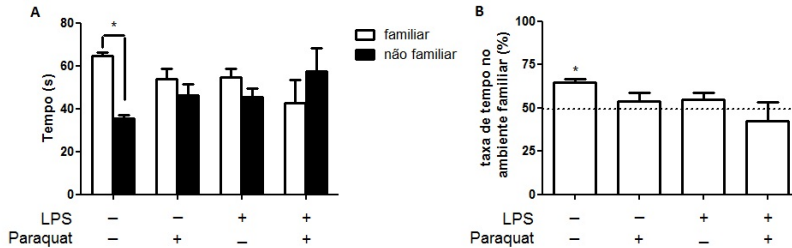


Figura 23. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste de discriminação olfatória em camundongos adultos 15 dias após o tratamento. Tempo gasto no ambiente familiar e não familiar (A) e relação do tempo (%) gasto no ambiente familiar (B). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina, 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo Experimental 3). Os dados foram expressos pela média \pm E.P.M ($n = 7-9$). Análise estatística pelo Teste T de *Student* entre grupos (familiar x não-familiar) $*p < 0,05$ quando comparado ao tempo no ambiente familiar (A) e ANOVA duas vias, seguido do teste de Newman-Keuls (B) $*p < 0,05$ quando comparado com a constante de 50%.

No dia experimental 38, foi realizado o teste do reconhecimento social, utilizado para avaliar a memória social, além de inferir indiretamente a capacidade olfatória do animal. Como apresentado na Figura 24A, os camundongos que receberam salina (grupo controle), assim como os animais que receberam PQ, foram capazes de reconhecer o animal jovem pois apresentaram um menor tempo de investigação quando expostos pela segunda vez a ele ($p < 0,05$), evidenciando a integridade da memória social de curto prazo. No entanto, os grupos que receberam LPS ($p = 0,42$) ou LPS + PQ ($p = 0,66$) apresentaram um tempo de investigação semelhante na primeira e segunda exposição, indicando um déficit cognitivo e/ou olfatório. Na Figura 24B, pode-se observar este efeito de modo mais evidente, onde os dados estão representados na forma de taxa de investigação (tempo de exploração no 2º encontro/1º encontro), mostrando um aumento significativo ($p < 0,001$) nos grupos expostos ao LPS ou LPS + PQ. O LPS apresentou efeito significativo principal neste teste [$F_{(1,22)} = 52,62$; $p < 0,0001$], mas não houve interação entre os tratamentos [$F_{(1,22)} = 0,06$; $p = 0,81$].

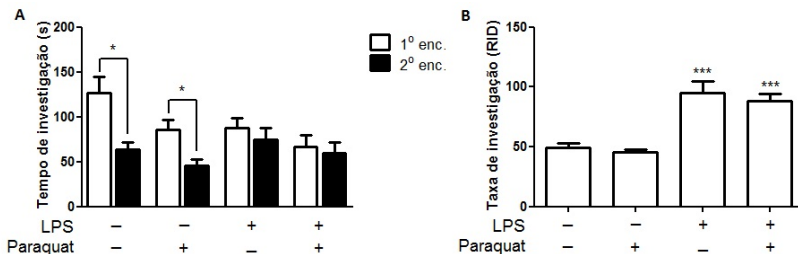


Figura 24. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste de reconhecimento social em camundongos adultos 38 dias após o tratamento. Tempo de investigação do 1º e 2º encontro (A) e Taxa de investigação (B). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (n = 7-9). Análise estatística pelo Teste T de *Student* entre grupos (1ª exposição x 2ª exposição); * $p < 0,05$ quando comparado a 1ª exposição (A) e ANOVA de duas vias, seguido do teste de Newman-Keuls; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (B).

O teste *rotarod* foi realizado no dia experimental 60, logo após o teste ENS. A performance motora dos animais expostos ao LPS e/ou PQ não foi alterada de modo significativo; não houve diferença na latência para a primeira queda em nenhum grupo teste quando comparado ao controle (Figura 25A). A ANOVA de duas vias apontou para um efeito principal do LPS neste teste [$F_{(1,41)} = 5,99$; $p = 0,019$]. A média do número de quedas foi mais alta nos grupos LPS e LPS + PQ quando comparados ao grupo controle, mas a diferença não foi significativa ($p = 0,20$ e $p = 0,22$, respectivamente) (Figura 25B).

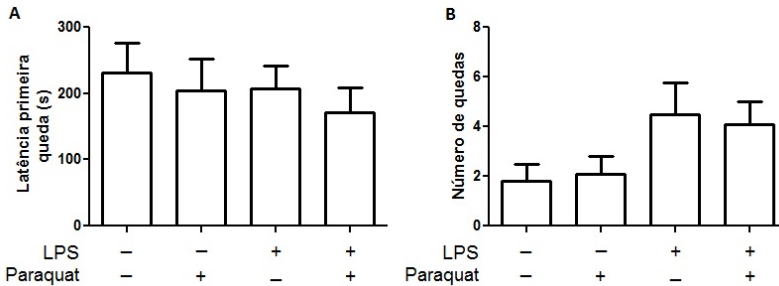


Figura 25. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no teste da barra giratória “rotarod” em camundongos adultos 60 dias após o tratamento. Tempo de latência para a primeira queda (A) e número de quedas (B). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M (n = 11-13). Análise estatística através teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn.

5.1.3.3 Efeitos de longo prazo da administração sistêmica de LPS, PQ ou LPS + PQ nos parâmetros relacionados ao metabolismo energético mitocondrial, estresse oxidativo e na imunomarcção para TH

Sessenta dias após o tratamento com LPS e/ou PQ, o sangue periférico foi coletado, centrifugado e a partir do plasma foram obtidos os dados expostos na Tabela 4. Não foram observadas alterações significativas na maior parte dos parâmetros analisados: colesterol, triglicerídeos, ureia, AST e ALT. A única alteração observada foi na concentração de glicose sanguínea, onde houve um efeito principal do LPS [$F_{(1,20)} = 9,05$; $p < 0,01$]: animais expostos ao LPS + PQ apresentaram um aumento significativo ($p < 0,001$) nos níveis de glicose plasmática. Porém, não foi observada interação entre os tratamentos de LPS e PQ [$F_{(1,20)} = 0,02$; $p = 0,87$].

Tabela 4: Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade nos parâmetros bioquímicos plasmáticos de camundongos 60 dias após o tratamento.

Grupos	Coolesterol (mg/dL)	Triglic. (mg/dL)	Glicose (mg/dL)	Uréia (mg/dL)	AST (nmol/mL)	ALT (nmol/mL)
Controle	60,9 ± 4,6	61,1 ± 5,4	45,4 ± 4,9	54,4 ± 3,5	357,6 ± 20,4	215,6 ± 29,4
PQ	75,4 ± 11,3	69,0 ± 9,0	56,2 ± 7,6	52,7 ± 9,6	364,0 ± 23,5	178,6 ± 58,8
LPS	66,2 ± 5,3	58,4 ± 6,2	67,1 ± 3,6	57,9 ± 6,3	304,0 ± 26,8	182,2 ± 28,2
LPS+PQ	73,3 ± 1,9	59,1 ± 8,4	87,5 ± 9,0*	50,4 ± 3,8	358,2 ± 35,9	195,8 ± 27,9

ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey;

Os dados foram expressos pela média ± erro padrão;

* $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle ($n = 5-7$).

As amostras de estriado e córtex cerebral foram isoladas e homogeneizadas para as análises seguintes. Inicialmente foi avaliada a atividade dos complexos I e II da cadeia respiratória mitocondrial, para avaliar o efeito a longo prazo das administrações sistêmicas de LPS, PQ e LPS + PQ. Interessantemente, o tratamento foi capaz de afetar o metabolismo mitocondrial de modo significativo. O PQ promoveu um significativo efeito principal [$F_{(1,14)} = 7,55$; $p = 0,016$] na atividade do complexo I no estriado 60 dias pós-tratamento. Além disso, como mostrado na Figura 26A, houve uma diminuição significativa na atividade do complexo I no estriado de animais tratados com LPS, PQ e LPS + PQ. De modo semelhante, o tratamento com PQ causou o efeito principal na atividade do complexo II no córtex [$F_{(1,14)} = 16,14$; $p = 0,001$], onde se verificou uma diminuição significativa na atividade deste complexo nos grupos que receberam PQ e LPS + PQ (Figura 26D). Não houve interação entre os fatores [$F_{(1,14)} = 0,32$; $p = 0,58$]. Além disso, não houve alterações significativas na atividade do complexo I no córtex cerebral (Figura 26B), assim como no complexo II no estriado (Figura 26C).

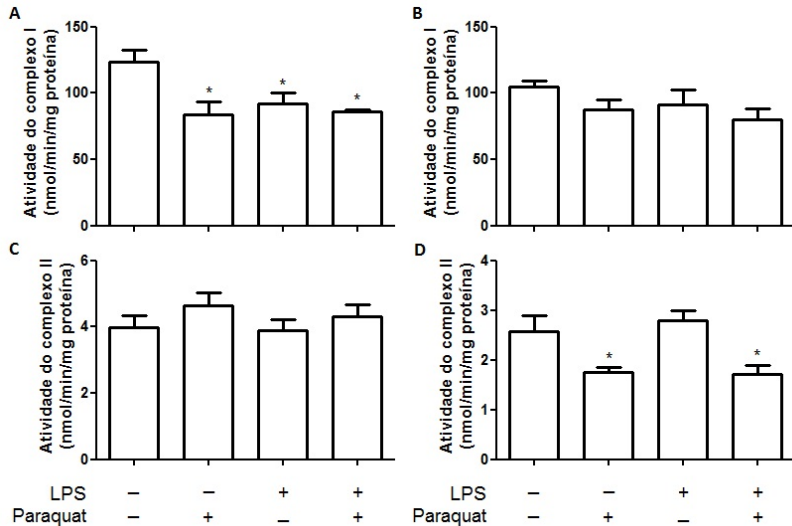


Figura 26. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade de NADH desidrogenases (complexo I) no estriado (A) e córtex (B) e atividade do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 60 dias após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Quanto à atividade das enzimas antioxidantes, a administração de LPS apresentou um significativo efeito principal sobre a atividade da enzima GPx no córtex cerebral [$F_{(1,19)} = 8,85$; $p < 0,01$], o que corroborou com a significativa redução na atividade de GPx ($p < 0,05$) (Figura 27D) no córtex cerebral de animais tratados com LPS + PQ 60 dias pós tratamento. Não houve alterações significativas na atividade de GR no estriado (Figura 27A) e córtex (Figura 27B), bem como na atividade de GPx no estriado (Figura 27C).

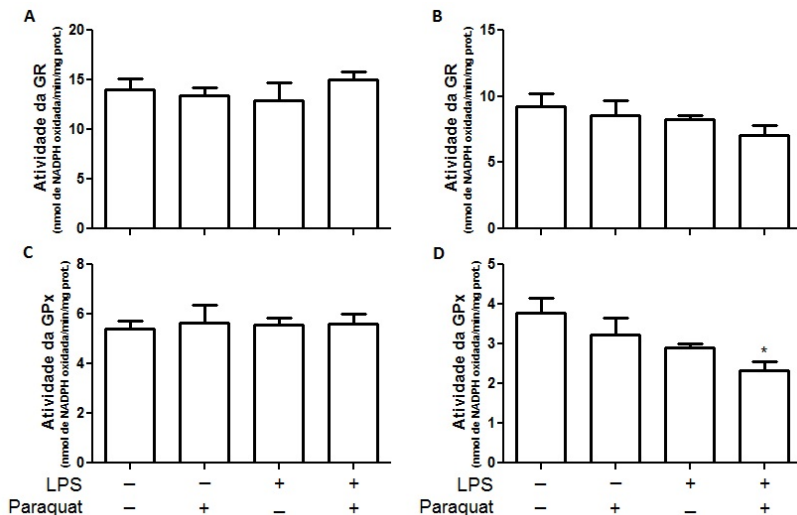


Figura 27. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade das enzimas glutatona redutase (GR) no estriado (A) e córtex (B) e glutatona peroxidase (GPx) no estriado (C) e córtex (D) de camundongos 60 dias após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0.9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver *Protocolo experimental 3*). Os dados são representados como média \pm E.P.M (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

O tratamento com LPS e/ou PQ não alteraram os níveis de NPSH no estriado (28A) e córtex cerebral (28B), assim como não alteraram a atividade da enzima catalase no estriado (29A) e córtex cerebral (29B) de camundongos 60 dias pós-tratamento.

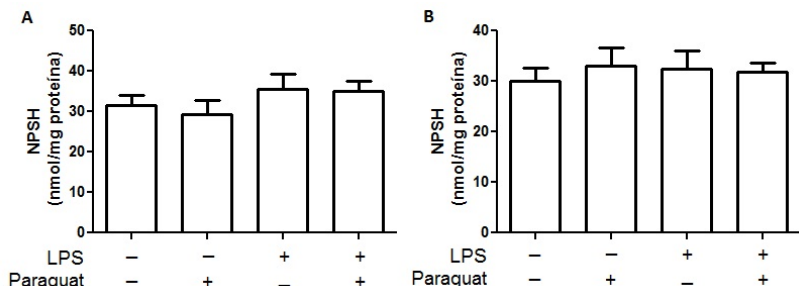


Figura 28. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis de grupos tióis não proteicos (NPSH) no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 60 dias após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0.9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver *Protocolo experimental 3*). Os dados são representados como média \pm E.P.M (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.

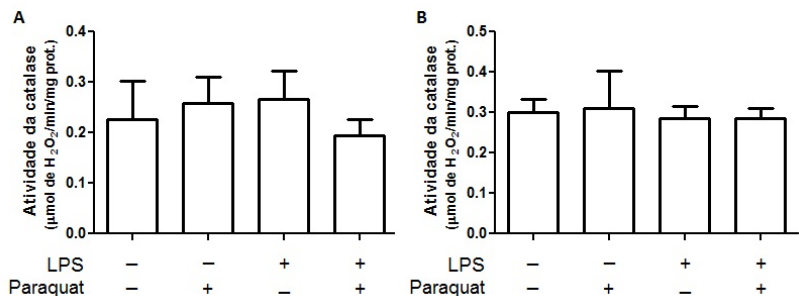


Figura 29. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ na atividade da enzima catalase no estriado (A) e córtex cerebral (B) de camundongos 60 dias após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0.9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver *Protocolo experimental 3*). Os dados são representados como média \pm E.P.M (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.

Com relação aos parâmetros de dano oxidativo e nitrosativo, observou-se um significativo efeito principal do LPS nos níveis de 3-NT no estriado [$F_{(1,19)} = 22,63$; $p < 0,001$] de camundongos 60 dias pós-tratamento, indicando um aumento marcante de dano em proteínas por espécies reativas de nitrogênio. Subsequente análise pelo teste *post hoc*

mostrou um significativo aumento nos níveis de 3-NT no estriado de camundongos tratados com LPS ($p < 0,01$) e LPS + PQ ($p < 0,01$) quando comparados aqueles do grupo controle (Figura 30C). Não foi evidenciado alterações significativas nos indicadores de peroxidação lipídica analisados MDA (Figura 30A) e 4-HNE (Figura 30B) no estriado em função dos tratamentos.

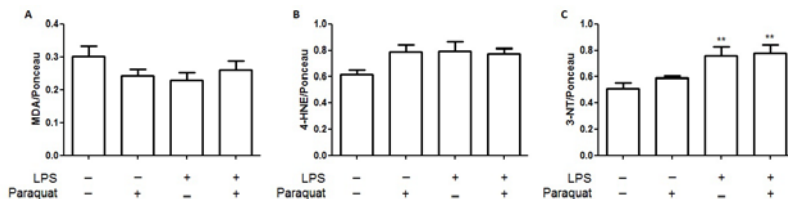


Figura 30. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ nos níveis das enzimas malondialdeído (MDA)(A), 4-hidroxinonenal (4-HNE) e 3-nitrotirosina (3-NT) no estriado de camundongos 60 dias após o tratamento. Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver *Protocolo experimental 3*). Os dados são representados como média \pm E.P.M (n = 6-7). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls; ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo controle.

As administrações sistêmicas de PQ, LPS e LPS + PQ não foram capazes de promover mudanças significativas no número de neurônios positivos para TH, tanto em estriado (Figura 31A,B) como na substância negra (Figura 31C,D) de camundongos 60 dias após o tratamento.

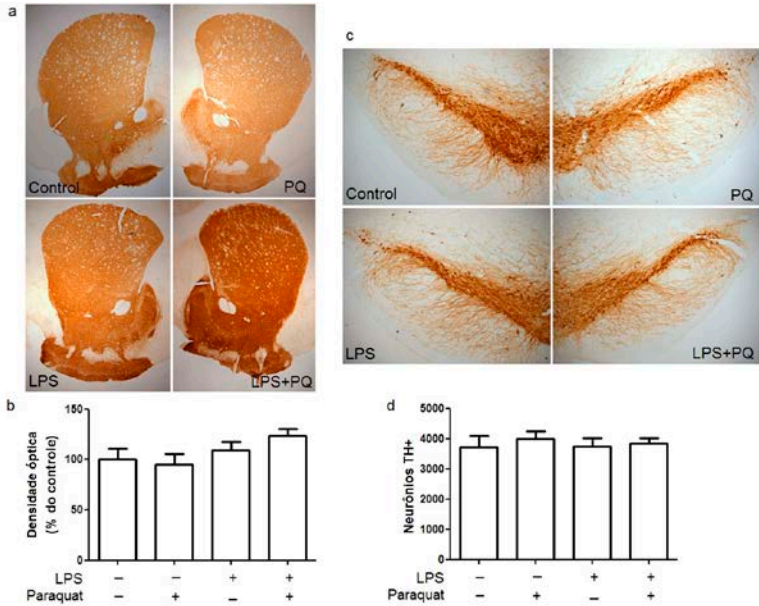


Figura 31. Efeitos da administração sistêmica de LPS e PQ no imunoconteúdo de tirosina hidroxilase (TH) no estriado e substância negra de camundongos 60 dias após o tratamento. (A) Imagens representativas da imunomarcagem para TH e (B) quantificação relativa do número de neurônios TH+ no estriado. (C) Imagens representativas da imunomarcagem para TH e (D) quantificação relativa do número de neurônios TH+ no mesencéfalo ventral contendo SNpc de camundongos (escala = 200 μ m). Os animais foram tratados intraperitonealmente com LPS (3, 5 e 7 mg/kg), PQ (5 mg/kg) ou veículo (salina 0,9%) uma vez ao dia durante 7 dias (ver Protocolo experimental 3). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 4). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Newman-Keuls.

5.2 CAPITULO II: Efeitos do pré-tratamento com PQ e do tratamento com LPS em células neurais e gliais

Tendo em vista a toxicidade do PQ em sistemas biológicos e sua relação com a DP, e considerando que a rota de toxicidade do PQ é pouco conhecida, é importante compreender os mecanismos pelos quais o PQ pode afetar o cérebro, bem como sua relação com os processos neuroinflamatórios. Sendo assim, no intuito de verificar os mecanismos de toxicidade do pesticida PQ em células do SNC, o objetivo do capítulo II foi estudar o possível efeito sensibilizante (*priming*) da exposição ao PQ seguido da exposição ao LPS em cultivos primários de micróglia (CPM), cultivo primário mesencefálico de neurônio-glia (CPN-G), assim como em cultivo de células microgliais BV-2 e células astrocíticas (C6). Tais cultivos foram utilizados por tratar-se de modelos *in vitro* para investigar processos neuroinflamatórios. De forma mais específica, CPN-G são especialmente úteis em estudos com degeneração e neuroproteção de neurônio dopaminérgicos (1-2% do total de células), além de serem uma ótima ferramenta para estudar a relação neurônio-glia frente a insultos tóxicos. Por outro lado, o tipo CPM representa um cultivo quase puro de células microgliais que possibilita associar fenômenos especificamente a este tipo de população glial (Gao et al., 2002, 2003; Qin et al., 2002).

Para saber se o PQ é capaz de sensibilizar (*prime*) a micróglia tornando-a mais vulnerável a um segundo insulto inflamatório, foi inicialmente necessário encontrar a concentração de LPS que promovesse uma resposta inflamatória de magnitude “mediana”, de modo que na presença de um segundo insulto, exista margem para identificar a resposta aumentada. Primeiramente, realizou-se um estudo de “concentração-resposta” com diferentes concentrações de LPS em células microgliais BV-2. O principal objetivo foi verificar se células BV-2 são uma boa ferramenta para os estudos de *priming* com o PQ; além disso, investigar em qual concentração este efeito poderia ser observado. A concentração de PQ que utilizou-se nestes estudos *in vitro* foi baseada em estudos anteriores que relataram a degeneração do neurônio dopaminérgico em cultura na concentração de 10 μM (KLINTWORTH *et al.*, 2007); o laboratório da Dra. Michele Block (Indianápolis/USA) estabeleceu a concentração de 0,5 μM para estudos de *priming*, onde o objetivo não é a neurodegeneração e sim fenômenos inflamatórios.

O ensaio de Griess foi utilizado para avaliar a resposta inflamatória através da formação de nitrito 24 h após o tratamento. A liberação de ON

pela micróglia é um indicador de resposta inflamatória (TEISMANN e SCHULZ, 2004). Foi possível observar que as concentrações utilizadas não são tóxicas para as células neste tempo experimental, uma vez que não houve diferença na viabilidade celular pelo teste de MTT (Figura 32A, C e E). Como observado na Figura 32, o pré-tratamento com o pesticida PQ (0,5 μM) não afeta a produção e liberação de nitrito pelas células. Por outro lado, o tratamento com 1 ng/mL de LPS foi capaz de promover um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de nitrito quando comparado ao grupo controle (Figura 32B). As células pré-tratadas com PQ e tratadas com LPS apresentaram um aumento significativo na produção de nitrito quando comparado com o grupo controle, mas não quando comparado com o grupo LPS, indicando que o co-tratamento de PQ + LPS não promove o aumento da resposta inflamatória e, portanto, não houve efeito *priming* do PQ nestas condições. Resposta semelhante foi observada com as concentrações mais baixas de LPS 2,5 ng/mL (Figura 32D) e 5 ng/mL (Figura 32F) onde células tratadas com LPS sozinho ou em associação com o PQ apresentaram resposta inflamatória semelhante, não evidenciando efeito *priming* do PQ. Além disso, ficou claro que a linhagem microglial BV-2 apresenta resposta inflamatória – avaliada pela liberação de nitrito no meio celular – dependente da concentração de LPS à qual foi exposta. Células expostas a 1, 2,5 e 5 ng/mL de LPS liberaram, em média, cerca de $\sim 12 \mu\text{M}$, $\sim 8 \mu\text{M}$ e $\sim 3 \mu\text{M}$ de nitrito, respectivamente, confirmando que as condições da célula e o preparo das soluções de LPS foram adequados.

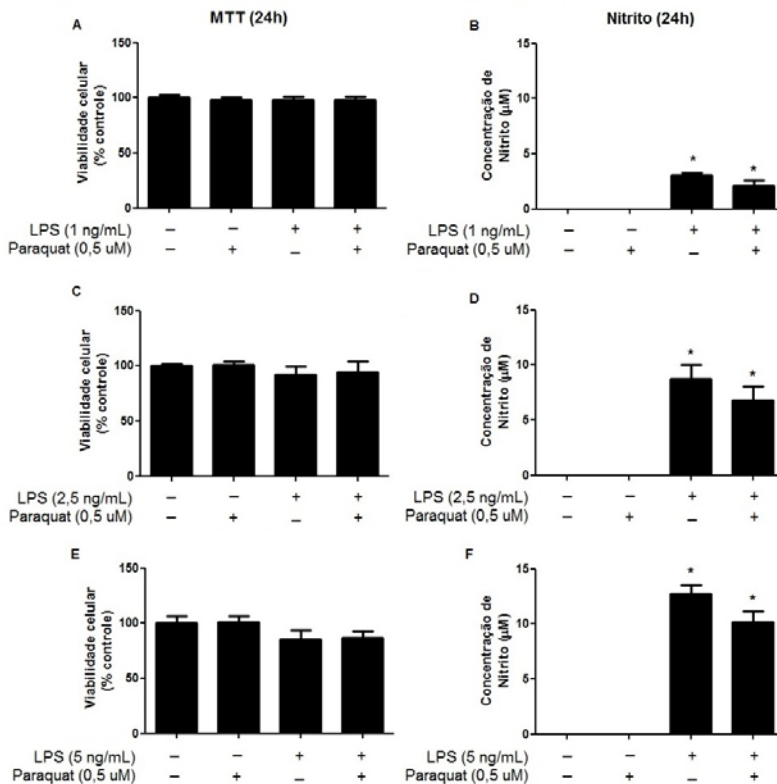


Figura 32. Efeitos do pré-tratamento com PQ (0,5 μ M) e do tratamento com LPS (1, 2,5 e 5 ng/mL) em células microgliais BV-2. Células BV-2 foram pré-tratadas com PQ (0,5 μ M) e 30 min após tratadas com LPS (1, 2,5 e 5 ng/mL). Vinte e quatro horas após o tratamento foi avaliada a viabilidade celular (A, B e C) e os níveis de nitrito (D, E e F). Os dados são representados como média \pm E.P.M. (n = 3). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Bonferroni; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

Nesse sentido, também investigou-se a resposta isolada do cultivo primário de micróglia. Pôde-se observar que células microgliais de cultivo primário expostas ao LPS (5 ng/mL) sozinho ou em pré-tratamento com o PQ (0,5 μ M) apresentam o mesmo padrão de resposta inflamatória no que se refere a liberação da citocina TNF- α em 3h (Figura 33A) e em 24h (Figura 33B) ($p < 0,05$, comparado com o grupo controle), bem como na produção de nitrito em 24 h (Figura 33C) ($p < 0,05$,

comparado com o grupo controle). Não houve indício de efeito *priming* nestes cultivos. Além disso, os tratamentos com LPS e/ou PQ parecem não afetar a viabilidade celular destas células (Figura 33D).

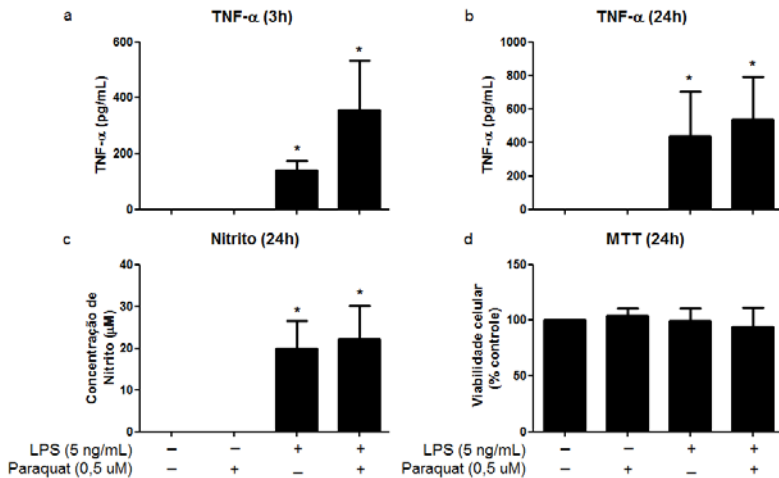


Figura 33. Efeitos do pré-tratamento com PQ (0,5 μM) e do tratamento com LPS (5 ng/mL) em células de cultivo primário de micróglia. Células microgliais foram pré-tratadas com PQ (0,5 μM) e 30 min após tratadas com LPS (5 ng/mL). Três e 24 horas após o tratamento foi avaliado os níveis de TNF-α (A e B, respectivamente), níveis de nitrito (C) e viabilidade celular (D). Os dados são representados como média ± E.P.M. (n = 3). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Bonferroni; *p < 0,05 quando comparado ao grupo controle.

Devido à ausência do fenômeno *priming* nas células BV2 e CPM, decidiu-se investigar se tal evento ocorre em CMN-G, e qual a influência destes dois agentes tóxicos em neurônios dopaminérgicos. Com base nos estudos anteriores com células BV-2 e CPM, optou-se por realizar os próximos testes utilizando a concentração de 2,5 ng/mL. Para isso, os CMN-G foram pré-tratados com PQ (0,5 μM) e, 30 min após, tratados com LPS 2,5 ng/mL. Três horas após o tratamento, os níveis de TNF-α no meio celular foram medidos e pôde-se observar que células pré-tratadas com PQ e tratadas com LPS apresentam uma resposta significativamente maior do que aquelas tratadas apenas com LPS (Figura 34A) (p < 0,05), indicando um efeito *priming* atribuído ao PQ na presença

de um segundo insulto inflamatório (LPS). Células tratadas apenas com PQ não apresentam liberação da citocina TNF- α . Vinte e quatro horas após o tratamento, os níveis de TNF- α dos cultivos estavam semelhantes tanto para as tratadas com LPS quanto para as que receberam PQ e LPS (Figura 34B) ($p < 0,05$, comparado com o grupo controle).

Outro parâmetro avaliado no tempo de 24 horas foram os níveis de nitrito, onde, uma vez mais, observou-se que células pré-tratadas com PQ e tratadas com LPS apresentam uma resposta significativamente maior do que aquelas tratadas apenas com LPS (Figura 34C) ($p < 0,05$) caracterizando efeito *priming* atribuído ao PQ. Além de ser um indicador da resposta inflamatória, o ON é considerado tóxico para neurônios dopaminérgicos (RUANO *et al.*, 2006; WATANABE, KATO e ARAKI, 2008).

Estabelecido tal fenômeno, decidiu-se verificar como estavam os neurônios dopaminérgicos destes cultivos celulares. Observou-se que neurônios de cultivos tratados com LPS apresentaram uma significativa diminuição ($p < 0,05$) na captação de dopamina (Figura 34D), onde o tratamento com PQ pareceu não afetar tal parâmetro.

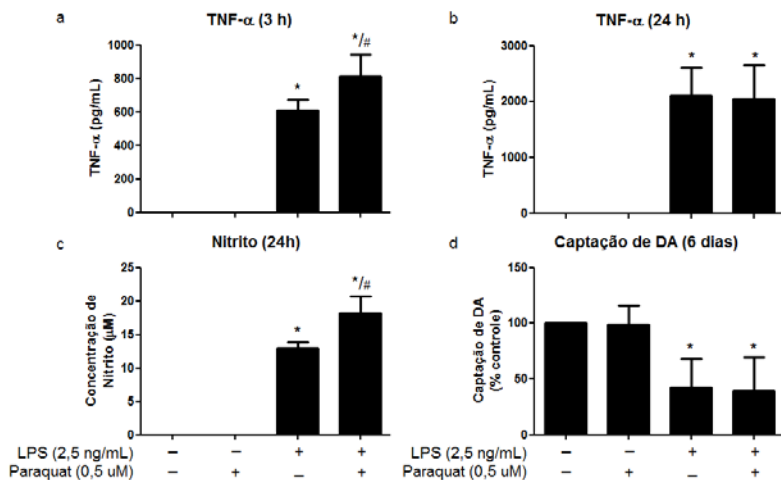


Figura 34. Efeitos do pré-tratamento de PQ (0,5 µM) e do tratamento com LPS (2,5 ng/mL) em células de cultivo primário mesencefálico de neurônio-glia de rato. Células de neurônio-glia foram pré-tratadas com PQ (0,5 µM) e 30 min após tratadas com LPS (2,5 ng/mL). Três e 24 horas após o tratamento foi avaliado os níveis de TNF- α (A e B, respectivamente), níveis de nitrito (C) e 6 dias após a captação de dopamina (D). Os dados são representados como média ± E.P.M. (n = 3). Análise estatística através de ANOVA de duas

vias, *post hoc* Bonferroni; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo LPS.

Além disso, realizou-se imunocitoquímica para TH (marcador de neurônio dopaminérgico) e Iba-1 (marcador de micróglia ativada). Desta forma, conseguiu-se observar que, semelhantemente aos dados obtidos na avaliação de captação de dopamina, neurônios tratados com LPS e PQ + LPS apresentam características semelhantes (Figura 35), especialmente na imunomarcagem para TH podemos observar indicações morfológicas de toxicidade neuronal como, por exemplo, a redução das prolongações neuronais.

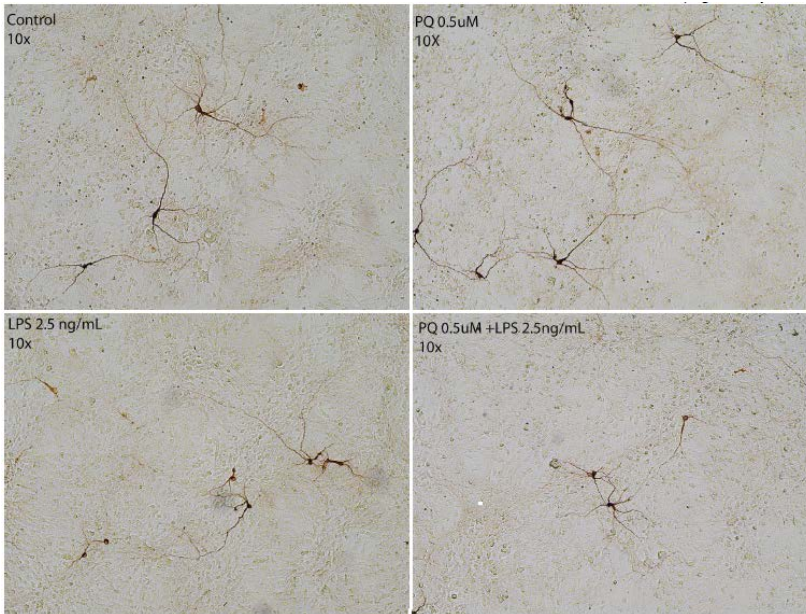


Figura 35. Efeito do pré-tratamento com paraquat (0,5 μM) e tratamento com LPS (2,5 ng/mL) na imunomarcagem de neurônios TH+ em cultivo primário de neurônio-glia de rato. Células de neurônio-glia foram pré-tratadas com PQ (0,5 μM) e 30 min após tratadas com LPS (2,5 ng/mL). Imagens representativas dos cultivos, aumento de 10X.

As micróglia, quando em repouso, são caracterizadas por longos processos bipolares ou unipolares e células com corpos alongados, enquanto que sua morfologia no estado ativo apresenta corpos celulares

arredondados e ameboides (ZHOU *et al.*, 2007). A morfologia da microglia foi analisada através da imunomarcção por Iba-1, uma proteína expressa seletivamente em microglia (QIN *et al.*, 2007). A Figura 36 apresenta imagens da imunomarcção para Iba-1, onde confirmou-se alguns dos achados anteriores, como a ausência de resposta inflamatória associada ao PQ. Além disso, células tratadas com LPS apresentaram uma elevada resposta inflamatória, onde a presença de microglia ativada foi evidente pela sua morfologia ramificada.

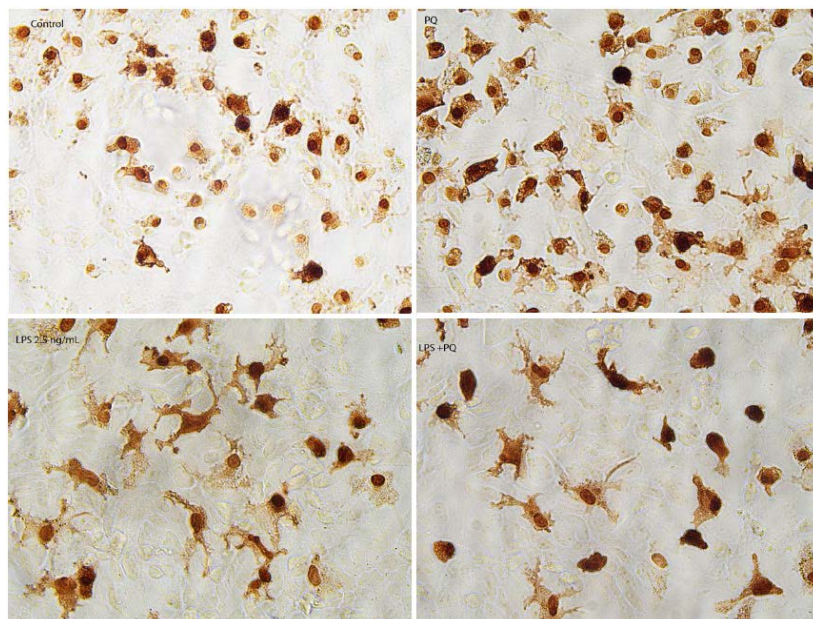


Figura 36. Efeito do pré-tratamento com paraquat (0,5 μ M) e tratamento com LPS (2,5 ng/mL) na imunomarcção de microglia ativada (IBA-1) em cultivo primário de neurônio-glia de rato. Células de neurônio-glia foram pré-tratadas com PQ (0,5 μ M) e 30 min após tratadas com LPS (2,5 ng/mL). Imagens representativas dos cultivos, aumento de 40X.

Finalmente, com o intuito de analisar o papel dos astrócitos no efeito *priming* promovido pelo PQ, utilizou-se a linhagem C6 de astrócitos e induziu-se a inflamação com LPS (1 ng/mL) e IFN- γ (50 U/mL), seguindo um protocolo previamente padronizado (FEINSTEIN *et al.*, 1994). No entanto, não conseguiu-se observar nenhum aumento

significativo na concentração de nitrito (Figura 37A). No entanto, quando expôs-se as células a uma solução contendo LPS (1 ng/mL), IFN- γ (50 U/mL) e TNF- α (60 ng/mL), observou-se um aumento significativo nos níveis de nitrito (Figura 37B) quando comparados aos do grupo controle ($p < 0,05$); Entretanto, o pré-tratamento com PQ não amplificou este efeito. Os dados indicam que a citocina TNF- α exerce um papel fundamental na resposta inflamatória em cultivos de células C6, mas que o pré-tratamento com PQ não afetou este fenômeno.

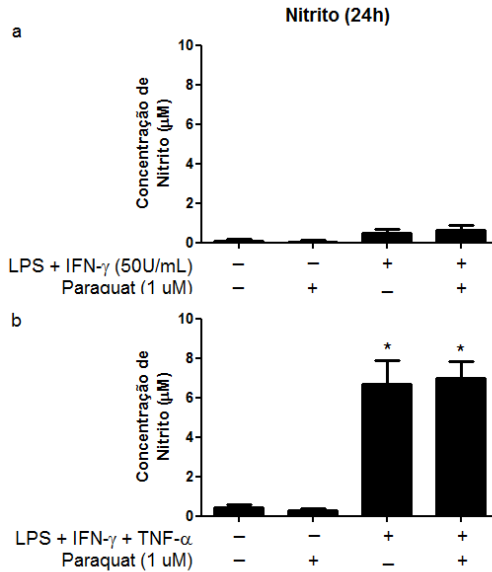


Figura 37. Efeito do pré-tratamento de PQ (1 μ M) e do tratamento com LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) (A) ou LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) + TNF- α (60 ng/mL) em células astrocíticas C6. Células C6 foram pré-tratadas com PQ (0,5 μ M) e 30 min após tratadas com LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) ou LPS (1 ng/mL) + IFN- γ (50 U/mL) + TNF- α (60 ng/mL). Vinte e quatro horas após o tratamento foi avaliada os níveis de nitrito. Os dados são representados como média \pm E.P.M. ($n = 3$). Análise estatística através de ANOVA de duas vias, *post hoc* Bonferroni; * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo controle.

6 DISCUSSÃO

A etiologia da DP esporádica e os mecanismos relacionados ao seu desenvolvimento ainda são alvo de ampla discussão. Além do fator envelhecimento, evidências experimentais e clínicas sugerem que a DP esteja associada a fatores ambientais como a exposição a pesticidas e metais pesados, bem como processos neuroinflamatórios que promovam a disfunção na BHE, ativação microglial e infiltração de linfócitos T (BLOCK, ZECCA e HONG, 2007; WEISS *et al.*, 2009).

A idéia de que o SNC representa uma região "imuno-privilegiada" devido à BHE foi atualizada depois de diversos estudos mostrarem interações entre os sistemas imune e nervoso (STEINMAN, 2004). De fato, a inflamação sistêmica induzida por padrões moleculares associados a patógenos conservados (PAMPs), tais como o LPS, pode desencadear a inflamação do SNC através de prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias utilizando vias neurais e humorais paralelas (KONSMAN, PARNET e DANTZER, 2002). Outros estudos mostraram alterações no transporte através da BHE e sua relação com condições neurodegenerativas, incluindo DP e DA, sugerindo que a interação entre BHE e sistema imunológico é um importante fator a ser considerado na fisiopatologia de doenças neurodegenerativas (KORTEKAAS *et al.*, 2005; ZLOKOVIC *et al.*, 2010). A relação entre eventos inflamatórios e doenças neurodegenerativas ficou mais próxima e intrigante depois que foi verificado que uma única injeção sistêmica de LPS (i.p.) desencadeou uma resposta imune persistente capaz de causar a perda de neurônios na SN, associada a déficits na função motora, e estes puderam ser revertidos com o uso de L-DOPA (QIN *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2008) – caracterizando assim um modelo animal de DP.

No presente estudo, investigamos os efeitos da administração sistêmica de LPS não apenas por sua associação a processos neurodegenerativos (QIN *et al.*, 2007; HOBAN *et al.*, 2013), mas também pelo seu potencial de promover disfunções na BHE (MINAMI *et al.*, 1998; VESZELKA *et al.*, 2003) e, assim, favorecer o acúmulo de substâncias tóxicas no SNC, tais como o PQ. De fato, observamos que administrações sistêmicas de LPS causaram o aumento da permeabilidade da BHE - evidenciado pelo aumento nas concentrações de NaFl no cérebro - no córtex cerebral e estriado de camundongos adultos. Além disso, doses repetidas de LPS mantiveram este efeito, confirmando que a inflamação sistêmica induzida por LPS promove o aumento da permeabilidade da BHE. A injeção periférica de LPS é um modelo amplamente utilizado para induzir a inflamação sistêmica e alguns desses

estudos mostraram que a injeção repetida de LPS é mais efetiva na alteração do transporte de BHE quando comparada a uma única injeção (BANKS *et al.*, 1999; XAIO *et al.*, 2001; NONAKA, SHIODA e BANKS, 2005). No presente estudo, o aumento transitório na permeabilidade BHE pôde ser observado por até 5 dias após as injeções, sendo que a BHE parece recuperar suas propriedades de permeabilidade seletiva após este período, não sendo mais observadas diferenças significativas entre os grupos controle e tratado com LPS. Durante estes 10 dias de disfunção na BHE (contando a partir da primeira injeção de LPS, onde já foi possível verificar aumento da permeabilidade), substâncias potencialmente tóxicas da circulação sanguínea podem chegar ao SNC com maior facilidade. Mesmo alterações transitórias na permeabilidade da BHE podem levar a danos teciduais permanentes (SOKRAB *et al.*, 1988). A BHE protege o SNC limitando a entrada periférica de moléculas e/ou células potencialmente nocivas. A entrada de toxinas, patógenos e células do sistema imune pode levar a disfunções neurais culminando na neurodegeneração (DANEMAN, 2012).

Neste contexto, diante de diversos eventos associados tanto a etiologia quanto ao desenvolvimento da DP, surge a hipótese de múltiplos *hits*, que propõem uma visão ampla e convergente sobre a fisiopatologia da doença. A hipótese sugere que ocorram interações entre distintos processos danosos ao sistema, e que estes pode culminar em determinado desfecho patológico como, por exemplo, a degeneração dos neurônios dopaminérgicos. Além da hipótese de múltiplos *hits*, o presente trabalho também considerou a limitada entrada do PQ no SNC. Um recente estudo demonstrou que, quando administrado sistemicamente (10 mg/kg/semana por 3 semanas), apenas 0,3% do PQ administrado consegue chegar no cérebro; tal fato colocou em dúvida a real neurotoxicidade do PQ (BRECKENRIDGE *et al.*, 2013).

Vale também lembrar que a maior parte dos casos de DP é esporádica e tem início tardio associado ao envelhecimento (TANNER e GOLDMAN, 1996). Neste trabalho, buscamos avaliar os principais efeitos da exposição sistêmica de PQ e LPS em um animal adulto saudável (10-12 semanas de idade). Sendo assim, o protocolo experimental foi construído a fim de expor camundongos adultos ao PQ (que em condições normais possui baixa taxa de influxo no SNC) nos tempos em que foi observado significativo aumento na permeabilidade da BHE (induzida pela administração de LPS). O estudo piloto com LPS + PQ utilizou a dose de PQ de 10 mg/kg e observamos elevada toxicidade na coadministração de LPS e PQ; o índice de mortalidade foi consideravelmente maior neste grupo (~90% de óbitos) quando

comparado ao grupos que receberam apenas LPS ou apenas PQ (~30% de óbitos). Para tanto, o protocolo experimental II foi desenvolvido para encontrar a dose mais adequada de PQ para os estudos de coadministração com o LPS. A alta dose de PQ associada à exposição sistêmica do LPS demonstrou mais uma vez ser letal. De fato, camundongos que receberam a dose de 7 mg/kg de PQ + LPS novamente apresentaram alta mortalidade (~75% de óbitos). Diante das avaliações comportamentais, bioquímicas e peso corporal dos animais e baseando-se na hipótese do aumento da biodisponibilidade de PQ pela abertura da BHE, a dose de 5 mg/kg de PQ foi escolhida para os experimentos subsequentes. Apesar de não ter ocorrido modificações significativas nos parâmetros bioquímicos analisados 22 dias após o tratamento, hipotetizou-se que esta seria a dose com maior potencial neurotóxico tardio (aos 60 dias de idade).

A etapa seguinte foi investigar os efeitos agudos (24 h) e de longo prazo (60 dias) da exposição sistêmica de PQ e LPS – administrados sozinhos ou em associação – no SNC, com foco nas regiões encefálicas envolvidas na DP. As análises bioquímicas (metabolismo mitocondrial, enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e neurodegeneração dopaminérgica) e comportamentais (condições motoras, cognitivas e olfatórias) foram realizadas no intuito de identificar os mecanismos neurotóxicos particulares do LPS e do PQ, bem como a possibilidade de um efeito sinérgico ou aditivo entre eles, de modo a relacioná-los com os sinais e sintomas da DP.

No presente estudo, demonstramos que a administração sistêmica de LPS ou LPS + PQ foi capaz de induzir um efeito de toxicidade aguda evidenciado pela diminuição do peso corporal (24 h após o tratamento) e pela diminuição da velocidade média no teste do campo aberto (48 h após o tratamento). Tais achados confirmam alguns parâmetros típicos do “comportamento doentio” (*sickness behavior*) induzido pelo processo inflamatório agudo (LPS), como a perda de peso e a diminuição na atividade locomotora (DANTZER *et al.*, 2008; KIRSTEN *et al.*, 2015; MING, SAWICKI e BEKAR, 2015; KRISHNA, DODD e FILIPOV, 2016). Uma vez no SNC, os mediadores inflamatórios atuam principalmente no hipotálamo, onde promovem um conjunto coordenado de mudanças comportamentais adaptativas em todo o sistema, o chamado “comportamento doentio”. Algumas características desta fase podem incluir letargia, depressão, ansiedade, mal-estar, perda de apetite, sonolência, hiperalgesia e falta de concentração (DANTZER *et al.*, 2008).

A resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência do indivíduo, mas também pode ser prejudicial se o estímulo não for controlado. Sabe-se que as células do sistema imune e mediadores

inflamatórios se infiltram-se no SNC durante o estado inflamatório e isso pode causar alterações estruturais e funcionais no cérebro (SANKOWSKI, MADER e VALDES-FERRER, 2015). Neste contexto, vários estudos relacionam a inflamação sistêmica à etiologia do processo neurodegenerativo (Perry et al., 2003, Pradhan et al., 1999). De particular interesse, o estresse oxidativo e a neuroinflamação têm um papel crucial na iniciação e progressão da perda neuronal de dopamina nigral na DP (MCGEER e MCGEER, 2004b; BEAL, 2005). Isso pode ser explicado em parte devido às características peculiares do SN, como capacidade reduzida antioxidante e alto teor de biomoléculas propensas à oxidação, como a dopamina, a melanina e os lipídios (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002). Além disso, o SN é particularmente rica em micróglia (LAWSON *et al.*, 1990; KIM *et al.*, 2000), permitindo que os neurônios dopaminérgicos residam em um ambiente particularmente frágil a qualquer insulto capaz de ativar a micróglia.

Outro fator importante associado à patogênese e progressão da DP - tanto para os casos familiares como esporádicos - é o comprometimento da produção de energia devido à disfunções na cadeia respiratória mitocondrial (ABOU-SLEIMAN, MUQIT e WOOD, 2006). De fato, os elétrons transportados na cadeia respiratória mitocondrial representam a principal fonte biológica de geração de EROs, onde o aumento das taxas metabólicas está diretamente associado ao aumento do estresse oxidativo (TURRENS, 2003; LAMBERT e BRAND, 2009). No presente estudo, observou-se que a administração de LPS sozinho promoveu um aumento na atividade do complexo I, 24 h após o tratamento. De forma semelhante, alguns estudos também verificaram aumento na atividade do complexo I em fatias de cérebro *ex vivo* tratadas com LPS (ERREA *et al.*, 2015) e na atividade do complexo II/III de camundongos que receberam LPS i.p. (NOH, JEON e SEO, 2014).

Por outro lado, os efeitos de longo prazo do LPS e/ou PQ causaram uma inibição na atividade do complexo I, corroborando com estudos anteriores que demonstram esse efeito associado à exposição ao PQ (COACHEME e MURPHY, 2008). Esses resultados também confirmam a alta sensibilidade do estriado aos desafios associados ao estresse oxidativo (LOTHARIUS e BRUNDIN, 2002). Além disso, a atividade do complexo II também foi inibida no córtex de camundongos tratados com apenas PQ ou LPS + PQ 60 dias após o tratamento. É interessante notar que novamente LPS e PQ não apresentaram efeito aditivo quando coadministrados, possivelmente isto ocorra porque tanto o LPS quanto o PQ ativam de modo direto ou indireto as mesmas vias neurotóxicas/pró-oxidantes. Além disso, a maior parte dos estudos

similares utilizando PQ avalia o metabolismo mitocondrial em um período agudo após injeções (BROOKS *et al.*, 1999; MCCORMACK *et al.*, 2002; PURISAI *et al.*, 2007; MANGANO *et al.*, 2011). Entretanto, o presente estudo demonstra que a disfunção mitocondrial ligada à exposição ao PQ está presente no estriado e no córtex de camundongos até 60 dias após a exposição. Além disso, tanto o LPS quanto o PQ causam disfunção mitocondrial na cadeia respiratória no córtex e no estriado. A diminuição na atividade do complexo I pode ser devido a baixa síntese de subunidades (SCHAPIRA, 2001), má formação do complexo de proteínas que o integram ou devido à perda de função por dano oxidativo (KEENEY *et al.*, 2006).

Devido ao fato de a fosforilação oxidativa na mitocôndria ser a maior fonte de EROs, há uma relação intrínseca entre alterações mitocondriais em doenças neurodegenerativas e o envolvimento do estresse oxidativo. Sabe-se que os efeitos tóxicos do PQ são classicamente associados a sua capacidade de iniciar um ciclo redox próprio que, por sua vez, favorece a formação de EROs, além de afetar o funcionamento da cadeia respiratória mitocondrial (FRANCO *et al.*, 2010). Em condições fisiológicas normais, EROs atuam na sinalização intracelular, resposta imunológica e expressão gênica. Acredita-se que a principal fonte de EROs seja o vazamento de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial. Outras fontes seriam a xantina oxidase, NADPH oxidases, fagócitos ativados e óxido nítrico sintases (NOS). Quando produzidas em excesso, as EROs podem afetar a integridade da célula. Contudo, as células dispõem de defesas contra o ataque de radicais livres, estas incluem enzimas, como a catalase, GPx e SOD, bem como defesas não enzimáticas, como a GSH, ácido ascórbico, vitamina E e outras (GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL, 2007). O estresse oxidativo ocorre quando a homeostase redox é descompensada pelo excesso de radicais livres ou deficiência de defesas antioxidantes. O estresse oxidativo está envolvido na patofisiologia de diversas doenças, dentre elas as doenças neurodegenerativas, como a DP (HALLIWELL, 2001).

Quando verificamos a atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, observamos que houve uma redução significativa na atividade da enzima catalase no córtex cerebral dos animais que receberam LPS ou LPS + PQ. A diminuição da atividade da catalase pode representar um desequilíbrio temporal no sistema antioxidante devido à geração anormal de EROs, especialmente H_2O_2 , tendo em vista que este é um inibidor da enzima (além de substrato) (BAUD *et al.*, 2004). Isto pode ocorrer mesmo que o sistema de glutatona não esteja afetado neste

momento, corroborando com nossos dados. O metabolismo do oxigênio gera diversas moléculas potencialmente, nocivas tais como superóxido, radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e H_2O_2 . O H_2O_2 pode ser precursor de $\bullet\text{OH}$ (altamente reativo) ou ser metabolizado em H_2O pela catalase, GPx e outras peroxidases (PATTEN *et al.*, 2010). O papel antioxidante da catalase, enzima com atividade peroxidase, é menor em baixos níveis de H_2O_2 , mas torna-se crucial em níveis mais elevados de H_2O_2 (GANDHI e ABRAMOV, 2012).

Interessantemente, quando analisamos os efeitos a longo prazo, a administração sistêmica de LPS + PQ promoveu a diminuição na atividade GPx no córtex cerebral 60 dias após o tratamento. Esta inibição na atividade GPx pode representar o comprometimento parcial da detoxificação de H_2O_2 e favorecimento de um estado pró-oxidante da célula.

No presente estudo, também demonstramos que a administração de LPS e LPS + PQ promoveu aumento significativo nos níveis de 3-NT no estriado 60 dias após o tratamento, onde o efeito principal foi atribuído a administração de LPS. Este efeito está de acordo com estudos anteriores em que se demonstrou que a administração sistêmica induzida por LPS aumenta os níveis de 3-NT no cérebro e no sangue de camundongos (CHOI *et al.*, 2006). Entre muitos fatores envolvidos nos processos inflamatórios, o ON tem posição importante, atuando inclusive como segundo mensageiro na sinalização da resposta inflamatória. O ON pode ser produzido enzimaticamente por macrófagos ou micróglia ativada, juntamente com o superóxido. O acúmulo de ON e superóxido favorece a formação de peroxinitrito; este e outras ERN são capazes de promover a oxidação e a nitração de biomoléculas (ALVAREZ e RADI, 2003), resultando em uma condição conhecida como estresse nitrosativo. É classicamente aceito que ERO e ERN atuem juntas na mediação do dano nas doenças neurodegenerativas (FLOYD, 1999; CHUNG, DAWSON e DAWSON, 2005). Neste contexto, estudos mostraram que a administração sistêmica de LPS aumenta a expressão e atividade do iNOS principalmente no mesencéfalo e SN (CZAPSKI *et al.*, 2007). Mais importante ainda, nossos dados também estão de acordo com um estudo anterior que descreveu elegantemente a associação entre aumento da nitrotirosina e hiperglicemia (também demonstrada no presente trabalho nos animais tratados com LPS + PQ). Yano e colaboradores (YANO *et al.*, 2004) sugerem por trás desse fenômeno o conceito de estresse oxidativo como consequência de uma hiperglicemia sustentada (crônica). De fato, a endotoxemia é geralmente acompanhada por alterações metabólicas pronunciadas e em especial no metabolismo da glicose. Por

exemplo, a hiperglicemia precoce é uma característica metabólica comum após a exposição a endotoxinas bacterianas (LANG *et al.*, 1985). Resumidamente, os níveis elevados de glicose aumentam a produção de superóxido o que, por sua vez, leva ao aumento da produção de ON com consequente vasodilatação. No entanto, em uma hiperglicemia crônica, a produção elevada e sustentada de superóxido permite a reação entre o superóxido e o NO, reduzindo os níveis de NO com consequente vasoconstrição e aumento da produção de peroxinitrito, o que por sua vez promove a formação de nitrotirosina (YANO *et al.*, 2004).

No que diz respeito aos parâmetros comportamentais, de modo geral, o protocolo com LPS (3, 5 e 7 mg/kg) e/ou PQ (5 mg/kg) administrados alternadamente, uma vez ao dia, durante uma semana, não mostrou ser impactante para a avaliação motora geral durante os 60 dias monitorados. Não foram observadas alterações significativas no teste ENS. Além disso, 60 dias após as administrações de LPS e PQ verificou-se um aumento discreto (não significativo) no número de quedas no teste do *rotarod* nos animais que receberam LPS ou LPS + PQ. O comprometimento da habilidade motora é a característica mais marcante da DP; tal sintoma é evidenciado por diversos autores em modelos animais que utilizam PQ (LITTELJOHN *et al.*, 2009; KANG *et al.*, 2010). Os animais que foram tratados com LPS + PQ apresentaram um déficit locomotor evidenciado pela menor velocidade média no teste do campo aberto, 48h após a última exposição; sugerimos que este dado não esteja relacionado a um déficit motor devido a processos neurodegenerativos e sim devido aos efeitos agudos da administração sistêmica de LPS.

Em humanos, os sintomas motores da DP não são detectados antes que 70-80% da dopamina estriatal tenha sido perdida. Atualmente, a presença de sintomas não-motores estão sendo reconhecidos dentro do quadro clínico do paciente com DP, tais sintomas seriam evidentes antes do aparecimento das disfunções motoras. Entre eles estão distúrbios do sono, disfunção autonômica, ansiedade, depressão, disfunção cognitiva e olfatória (BRAAK *et al.*, 2004; LANGSTON, 2006; TAYLOR *et al.*, 2009). Verificamos que animais expostos ao LPS e/ou PQ apresentaram déficit olfatório 15 dias após as administrações, sendo que o grupo LPS + PQ apresentou um prejuízo mais pronunciado. Além disso, os grupos que receberam LPS ou LPS + PQ também apresentaram prejuízo na memória social (o teste utiliza habilidades visuais e olfativas) 48 dias após as exposições ao LPS e PQ. Em ambos os testes a análise estatística apontou para o efeito principal do LPS.

Disfunções no trato olfatório associados à DP foram primeiramente relatados em 1975 (ANSARI e JOHNSON, 1975) e hoje diversas evidências reforçam tais indícios. Neste contexto, um estudo mostrou que tais anormalidades são observadas em até 85% dos pacientes (MULLER *et al.*, 2002). Além disso, estudos com modelos animais também têm relatado prejuízo olfatório (TAYLOR *et al.*, 2009; CZERNICZYNIENEC *et al.*, 2011). Há relatos de que a exposição pré- ou neo-natal ao LPS seja capaz de promover um déficit olfatório (KIRSTEN *et al.*, 2011; MACRAE, KENKEL e KENTNER, 2015). Além disso, células do bulbo olfatório parecem ser afetadas pela administração sistêmica desta endotoxina (OTA *et al.*, 2008). Outro estudo recente mostrou também comprometimento na memória dos camundongos 5 meses após a injeção sistêmica de LPS (MING, SAWICKI e BEKAR, 2015). Sugerimos que o prejuízo olfatório e cognitivo observado esteja associado ao efeito do LPS e que possivelmente representem sintomas não-motores associado aos danos neurotóxicos desta toxina.

Notavelmente, a maior parte dos efeitos neurotóxicos observados no presente estudo apontaram para o efeito principal do LPS, como revelado pela análise de variância de duas vias sobre o peso corporal, teste em campo aberto, reconhecimento social, rotarod, níveis plasmáticos de glicose, níveis de 3-NT no estriado e atividade GPx no córtex (60 dias após o tratamento). Evidências sugerem que os eventos inflamatórios periféricos podem promover a progressão da doença, bem como aumentar a gravidade da doença (COMBRINCK, PERRY e CUNNINGHAM, 2002; JAEGER *et al.*, 2009). Nossos dados sugerem que a inflamação sistêmica parece ser um importante fator capaz de desencadear e amplificar eventos tóxicos, inclusive neurotóxicos. A partir de dados da literatura, parece ser razoável assumir que, independentemente da natureza dos fatores desencadeantes, um ciclo pode existir: (i) ativação microglial causar neurodegeneração e a lesão neuronal que, por sua vez, (ii) pode levar à ativação glial, o que aumenta ainda mais a neurodegeneração (COMBRINCK, PERRY e CUNNINGHAM, 2002; JAEGER *et al.*, 2009).

Também deve ser considerado aqui que apenas estudamos o córtex e o estriado, 24 horas ou 60 dias após a estimulação de PQ e/ou LPS, que pode não representar a expressão cerebral global dessas enzimas (metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo). Em nosso estudo, não encontramos diferenças significativas nos níveis de neurônios TH+ no estriado e SN e deficiência motora, sugerindo que neste protocolo não há neurodegeneração induzida por LPS, PQ ou LPS + PQ, embora evidenciou-se uma significativa deficiência não-motora. Além disso,

tendo em conta a natureza de múltiplos sistemas da DP, é facilmente plausível hipotetizar o envolvimento não só do sistema nigrostriatal dopaminérgico (amplamente ligado à deficiência motora), mas também de outras áreas cerebrais incluindo regiões serotoninérgicas, noradrenérgicas, colinérgicas e do tronco cerebral que têm sido associadas aos sintomas não-motores.

Diante dos resultados encontrados utilizando um modelo animal para estudar a toxicidade do LPS e do herbicida PQ, decidimos investigar também os efeitos *in vitro* de tais substâncias, mas neste momento utilizando uma abordagem direcionada a neuroinflamação e as células do SNC responsáveis por tal resposta imune. Estudos *in vitro* são ferramentas importantes por permitirem a compreensão de eventos celulares, sem a “interferência” da resposta sistêmica, e assim facilitar a identificação de fenômenos celulares.

Neste contexto, a proposta de investigar a interação entre LPS e PQ pareceu promissora, pois reproduziria com maior poder a condição humana. De particular interesse, o fator inflamatório é possivelmente o mais complexo e intrigante. No entanto, muito pouco se sabe sobre a interação dos processos inflamatórios e a exposição a pesticidas e quais fenômenos moleculares estariam envolvidos. Assim, o objetivo do estudo *in vitro* foi investigar os possíveis mecanismos de neurotoxicidade induzidos pela endotoxina LPS e pelo herbicida PQ, onde um fator poderia estar interferindo na capacidade neurotóxica do outro.

Um estudo utilizando modelo de neurotoxicidade induzida pelo PQ em camundongos chamou a atenção ao constatar que uma injeção de PQ não é capaz de promover a neurodegeneração, mas predispõe as células dopaminérgicas à degeneração uma vez submetidas a um novo desafio (as injeções seguintes de PQ) (MCCORMACK *et al.*, 2005). Além disso, Purisai e colaboradores (PURISAI *et al.*, 2007) observaram um aumento do número de células com características típicas da microglia ativada na SNpc de camundongos após uma única exposição ao PQ. Os mecanismos responsáveis por este efeito “*priming*” parece ser relevante quando relacionado à ação de fatores que aumentam a vulnerabilidade das células dopaminérgicas aos processos degenerativos na DP (PURISAI *et al.*, 2007).

A neuroinflamação é um fenômeno que ocorre quando a micróglia é ativada com consequente liberação de citocinas, quimiocinas, EROs e ERNs em resposta ao estímulo estressor (INNAMORATO, LASTRES-BECKER e CUADRADO, 2009; TANSEY e GOLDBERG, 2010; GRAEBER, LI e RODRIGUEZ, 2011). As micróglia atuam como os macrófagos residente no cérebro e sua ativação é, muitas vezes,

necessária para a recuperação de neurônios frente a insultos agudos. No entanto, é amplamente aceito que os efeitos da ativação microglial crônica são neurotóxicos (CZEH, GRESSENS e KAINDL, 2011), de modo que a microgliose reativa (ativação microglial em resposta ao dano neural) tem sido associadas à patogênese da neurodegeneração na DP e em modelos experimentais da doença (GAO *et al.*, 2003a; GAO *et al.*, 2003b; MCGEER e MCGEER, 2004a).

No presente trabalho, observamos que o PQ foi capaz de induzir efeito *priming* em cultivos primários mesencefálicos de neurônio-glia; a resposta inflamatória (medida pelos níveis de TNF- α 3h e nitrito 24h após o tratamento) foi significativamente maior nas células pré-tratadas com PQ e tratadas com LPS do que naquelas que receberam apenas LPS. Sugerimos que o PQ promova a sensibilização de células microgliais através da ativação de fatores oxidantes/pró-inflamatórios mediados pelos neurônios; frente ao um segundo insulto inflamatório, micróglia *primed* pelo PQ apresentam uma resposta inflamatória mais elevada.

O efeito *priming* do PQ não foi encontrado em outros cultivos testados (com apenas um tipo celular, micróglia ou astrócito) indicando que tal fenômeno requer a presença de neurônios e células gliais como mediadores da resposta. Os cultivos primários mesencefálicos de neurônio-glia são compostos por astrócitos (50%), neurônios (40%) e micróglia (10%). São considerados um excelente modelo *in vitro* do mesencéfalo (fisiologia normal do cérebro) para estudos de interação neurônio-glia bem como estudos com degeneração ou neuroproteção de neurônios dopaminérgicos (que representam 1-2% dos neurônios nesta cultura) (QIN *et al.*, 2002).

Ainda foi possível observar que o tratamento com PQ sozinho não induziu resposta inflamatória *per se* no modelo utilizado. Os dados corroboram o estudo de Klintworth e colaboradores (KLINTWORTH, GARDEN e XIA, 2009), que também demonstrou que enquanto o LPS induziu uma resposta inflamatória acentuada em cultivo microglial e que o PQ não atuou diretamente sobre a micróglia para induzir a inflamação. Além disso, quando verificamos a atividade dos neurônios dopaminérgicos nestes cultivos 6 dias após o tratamento, observamos que a captação de dopamina dos neurônios dopaminérgicos tratados com LPS e PQ + LPS apresentavam capacidade igualmente reduzida. Da mesma forma, demonstramos através de análise por imunocitoquímica que o dano a neurônios dopaminérgicos (TH+) e a ativação microglial (Iba-1) ocorreram em grau semelhante em cultivos tratados com LPS e PQ + PQ. Sugerimos que o insulto inicial com PQ, mesmo sendo insuficiente para

causar dano neuronal, é capaz de sensibilizar a micróglia de modo a aumentar a resposta inflamatória nas primeiras 24h pós-exposição.

No presente estudo, avaliamos os efeitos neurotóxicos individuais ou em combinação do LPS e do herbicida PQ em modelos *in vivo* e *in vitro*. Em resumo, nossos dados suportam a hipótese de que a inflamação sistêmica desempenha um papel crucial nos processos neurodegenerativos. Nossos dados coletivamente nos levaram a propor que os processos inflamatórios podem perturbar a integridade da BHE, que por sua vez deixa o cérebro mais vulnerável ao estresse nitrosativo, e que os camundongos expostos a múltiplos desafios são propensos a apresentar um desequilíbrio no metabolismo mitocondrial, corroborando o trabalho anterior de outros pesquisadores. O modelo apresentado mostrou ser uma ferramenta útil e promissora em estudos de DP, uma vez que pudemos verificar importantes características não motoras em curto espaço de tempo, destacando a importância de se dar mais atenção ao contexto prodrômico e ao reconhecimento de sintomas não motores na DP. Através dos estudos *in vitro*, encontramos um possível mecanismo de toxicidade do PQ, promovendo o aumento da susceptibilidade dos neurônios dopaminérgicos a insultos tóxicos subsequentes. Mesmo em doses baixas e não sendo diretamente tóxico aos neurônios, um insulto inicial com PQ é capaz de sensibilizar a micróglia de modo a aumentar a resposta inflamatória e, por consequência, indiretamente, favorecer a morte neuronal. Em suma, nossos achados agregam novos conhecimentos neste campo de pesquisa e ajudam a verificar uma possível ligação entre a toxicidade induzida por PQ e o desafio imune periférico, especialmente no que se refere à etiologia da DP.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados podemos concluir que:

- Administrações sistêmicas de LPS são capazes de promover disfunção transitória da permeabilidade da BHE no estriado e córtex de camundongos adultos. Embora não foram analisados os níveis de PQ no SNC dos animais, é plausível hipotetizar uma maior entrada deste herbicida no estriado e córtex de camundongos tratados com LPS;

- Animais tratados com LPS sozinho ou em associação com o PQ apresentam sinais típicos (perda de peso e diminuição locomotora) de inflamação sistêmica aguda (*sickness behavior*), embora o PQ não tenha potencializado o efeito do LPS;

- A diminuição na atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial promovido pela administração de LPS e/ou PQ, presente no estriado e no córtex de camundongos até 60 dias após a exposição, pode estar relacionada a toxicidade individual de cada composto, não havendo efeito aditivo na coadministração destes. De qualquer forma, a permanência destas alterações aos 60 dias após os tratamentos indicar que os efeitos neurotóxicos são relativamente duradouros;

- A administração sistêmica de LPS em camundongos parece ser mais tóxica que a do PQ (ao menos nas doses utilizadas), sendo que a endotoxina apresentou um significativo efeito principal em várias alterações comportamentais e bioquímicas analisadas;

- O *protocolo experimental III*, estabelecido no presente trabalho, não reproduziu as principais características patológicas da DP (déficit motor e neurodegeneração dos neurônios dopaminérgicos); no entanto, foi possível observar sintomas prodômicos da DP, tais como disfunção no trato olfatório e cognitivo além de disfunção mitocondrial e estresse oxidativo, indicando que possivelmente este modelo seja promissor se os animais forem analisados por mais de 60 dias;

- Dados *in vitro* revelaram que o PQ é capaz de induzir efeito *priming* em cultivos primários mesencefálicos de neuroglia, aumentando a resposta inflamatória frente a um segundo estímulo;

- O efeito *priming* requer a presença de neurônios e/ou astrócitos como mediadores da resposta;
- O insulto inicial com PQ mesmo sendo insuficiente para causar dano neuronal, é capaz de sensibilizar a micróglia de modo a aumentar a resposta inflamatória nas primeiras 24h pós-exposição.

8 REFERÊNCIAS

ABOU-SLEIMAN, P. M.; MUQIT, M. M.; WOOD, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 207-19, 2006.

AEBI, H. *et al.* . Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. **Eur J Biochem**, v. 48, n. 1, p. 137-45, 1974.

AHMAD, I. *et al.* . The involvement of nitric oxide in maneb- and paraquat-induced oxidative stress in rat polymorphonuclear leukocytes. **Free Radic Res**, v. 42, n. 10, p. 849-62, 2008.

ALVAREZ, B.; RADI, R. Peroxynitrite reactivity with amino acids and proteins. **Amino Acids**, v. 25, n. 3-4, p. 295-311, 2003.

ANSARI, K. A.; JOHNSON, A. Olfactory function in patients with Parkinson's disease. **J Chronic Dis**, v. 28, n. 9, p. 493-7, 1975.

ARIMOTO, T. *et al.* . Interleukin-10 protects against inflammation-mediated degeneration of dopaminergic neurons in substantia nigra. **Neurobiol Aging**, v. 28, n. 6, p. 894-906, 2007.

BALDERESCHI, M. *et al.* . Pesticide exposure might be a strong risk factor for Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 63, n. 1, p. 128, 2008.

BANATI, R. B.; DANIEL, S. E.; BLUNT, S. B. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 13, n. 2, p. 221-227, 1998.

BANKS, W. A. Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 8, p. 973-84, 2005.

BANKS, W. A. *et al.* . Adsorptive endocytosis of HIV-1gp120 by blood-brain barrier is enhanced by lipopolysaccharide. **Exp Neurol**, v. 156, n. 1, p. 165-71, 1999.

BAUD, O. *et al.* . Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. **J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1531-40, 2004.

BAZZU, G. *et al.* . alpha-Synuclein- and MPTP-generated rodent models of Parkinson's disease and the study of extracellular striatal dopamine dynamics: a

microdialysis approach. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 9, n. 4, p. 482-90, 2010.

BEAL, M. F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. **Ann Neurol**, v. 58, n. 4, p. 495-505, 2005.

BEKRIS, L. M.; MATA, I. F.; ZABETIAN, C. P. The genetics of Parkinson disease. **J Geriatr Psychiatry Neurol**, v. 23, n. 4, p. 228-42, 2010.

BERMAN, S. B.; HASTINGS, T. G. Dopamine oxidation alters mitochondrial respiration and induces permeability transition in brain mitochondria: implications for Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 73, n. 3, p. 1127-37, 1999.

BERRY, C.; LA VECCHIA, C.; NICOTERA, P. Paraquat and Parkinson's disease. **Cell Death Differ**, v. 17, n. 7, p. 1115-25, 2010.

BLANDINI, F. Neural and immune mechanisms in the pathogenesis of Parkinson's disease. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 1, p. 189-201, 2013.

BLESA, J.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. **Front Neuroanat**, v. 8, p. 155, 2014.

BLOCK, M. L.; HONG, J. S. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 77-98, 2005.

BLOCK, M. L. *et al.* . Potent regulation of microglia-derived oxidative stress and dopaminergic neuron survival: substance P vs. dynorphin. **FASEB J**, v. 20, n. 2, p. 251-8, 2006.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 57-69, 2007.

BOCHE, D. *et al.* . TGFbeta1 regulates the inflammatory response during chronic neurodegeneration. **Neurobiol Dis**, v. 22, n. 3, p. 638-50, 2006.

BOKA, G. *et al.* . Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neurosci Lett**, v. 172, n. 1-2, p. 151-4, 1994.

BONNEH-BARKAY, D.; LANGSTON, W. J.; DI MONTE, D. A. Toxicity of redox cycling pesticides in primary mesencephalic cultures. **Antioxid Redox Signal**, v. 7, n. 5-6, p. 649-53, 2005.

- BRAAK, H. *et al.* . Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. **Acta Neuropathol**, v. 112, n. 4, p. 389-404, 2006.
- BRAAK, H. *et al.* . Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 121-34, 2004.
- BRECKENRIDGE, C. B. *et al.* . Pharmacokinetic, neurochemical, stereological and neuropathological studies on the potential effects of paraquat in the substantia nigra pars compacta and striatum of male C57BL/6J mice. **Neurotoxicology**, v. 37, p. 1-14, 2013.
- BROCHARD, V. *et al.* . Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **J Clin Invest**, v. 119, n. 1, p. 182-92, 2009.
- BROOKS, A. I. *et al.* . Paraquat elicited neurobehavioral syndrome caused by dopaminergic neuron loss. **Brain Res**, v. 823, n. 1-2, p. 1-10, 1999.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods Enzymol**, v. 113, p. 484-90, 1985.
- CARR, W. J. *et al.* . Olfactory recognition of conspecifics by domestic Norway rats. **J Comp Physiol Psychol**, v. 90, n. 9, p. 821-8, 1976.
- CARVEY, P. M. *et al.* . Prenatal exposure to the bacteriotoxin lipopolysaccharide leads to long-term losses of dopamine neurons in offspring: a potential, new model of Parkinson's disease. **Front Biosci**, v. 8, p. s826-37, 2003.
- CHANDRA, S. *et al.* . Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration. **Cell**, v. 123, n. 3, p. 383-96, 2005.
- CHEN, Y. *et al.* . Transport of paraquat by human organic cation transporters and multidrug and toxic compound extrusion family. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 322, n. 2, p. 695-700, 2007.
- CHO, B. P. *et al.* . Pathological dynamics of activated microglia following medial forebrain bundle transection. **Glia**, v. 53, n. 1, p. 92-102, 2006.
- CHOI, D. Y.; ZHANG, J.; BING, G. Aging enhances the neuroinflammatory response and alpha-synuclein nitration in rats. **Neurobiol Aging**, v. 31, n. 9, p. 1649-53, 2010.

CHOI, H. S. *et al.* . PEP-1-SOD fusion protein efficiently protects against paraquat-induced dopaminergic neuron damage in a Parkinson disease mouse model. **Free Radic Biol Med**, v. 41, n. 7, p. 1058-68, 2006.

CHOI, W. S. *et al.* . Mitochondrial complex I inhibition is not required for dopaminergic neuron death induced by rotenone, MPP+, or paraquat. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 39, p. 15136-41, 2008.

CHU, Y.; KORDOWER, J. H. Age-associated increases of alpha-synuclein in monkeys and humans are associated with nigrostriatal dopamine depletion: Is this the target for Parkinson's disease? **Neurobiol Dis**, v. 25, n. 1, p. 134-49, 2007.

CHUNG, K. K.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L. Nitric oxide, S-nitrosylation and neurodegeneration. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)**, v. 51, n. 3, p. 247-54, 2005.

CICCHETTI, F. *et al.* . Systemic exposure to paraquat and maneb models early Parkinson's disease in young adult rats. **Neurobiol Dis**, v. 20, n. 2, p. 360-71, 2005.

COACHE, H. M.; MURPHY, M. P. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. **J Biol Chem**, v. 283, n. 4, p. 1786-98, 2008.

COLTON, C. A. Heterogeneity of microglial activation in the innate immune response in the brain. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 4, n. 4, p. 399-418, 2009.

COMBRINCK, M. I.; PERRY, V. H.; CUNNINGHAM, C. Peripheral infection evokes exaggerated sickness behaviour in pre-clinical murine prion disease. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 7-11, 2002.

CORTI, O.; LESAGE, S.; BRICE, A. What genetics tells us about the causes and mechanisms of Parkinson's disease. **Physiol Rev**, v. 91, n. 4, p. 1161-218, 2011.

CORY-SLECHTA, D. A. *et al.* . Developmental pesticide models of the Parkinson disease phenotype. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 9, p. 1263-70, 2005.

CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. **Glia**, v. 61, n. 1, p. 71-90, 2013.

CUNNINGHAM, C. *et al.* . Central and systemic endotoxin challenges exacerbate the local inflammatory response and increase neuronal death during chronic neurodegeneration. **J Neurosci**, v. 25, n. 40, p. 9275-84, 2005.

CZAPSKI, G. A. *et al.* . Role of nitric oxide in the brain during lipopolysaccharide-evoked systemic inflammation. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 8, p. 1694-703, 2007.

CZECH, M.; GRESSENS, P.; KAINDL, A. M. The yin and yang of microglia. **Dev Neurosci**, v. 33, n. 3-4, p. 199-209, 2011.

CZERNICZYNIENEC, A. *et al.* . Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. **Free Radic Biol Med**, v. 51, n. 7, p. 1428-36, 2011.

DANEMAN, R. The blood-brain barrier in health and disease. **Ann Neurol**, v. 72, n. 5, p. 648-72, 2012.

DANTZER, R. *et al.* . Modulation of social memory in male rats by neurohypophyseal peptides. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 91, n. 3, p. 363-8, 1987.

DANTZER, R. *et al.* . From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 9, n. 1, p. 46-56, 2008.

DAVALOS, D. *et al.* . ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. **Nat Neurosci**, v. 8, n. 6, p. 752-8, 2005.

DAVID, S.; KRONER, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. **Nat Rev Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 388-99, 2011.

DAY, B. J. *et al.* . A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 22, p. 12760-5, 1999.

DE PABLOS, R. M. *et al.* . Dopamine-dependent neurotoxicity of lipopolysaccharide in substantia nigra. **FASEB J**, v. 19, n. 3, p. 407-9, 2005.

DEPINO, A. M. *et al.* . Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. **Eur J Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 2731-42, 2003.

DEXTER, D. T.; JENNER, P. Parkinson disease: from pathology to molecular disease mechanisms. **Free Radic Biol Med**, v. 62, p. 132-44, 2013.

DICKSON, D. W. Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 2, n. 8, 2012.

DOBBS, R. J. *et al.* . Association of circulating TNF-alpha and IL-6 with ageing and parkinsonism. **Acta Neurol Scand**, v. 100, n. 1, p. 34-41, 1999.

DRAGUNOW, M. *et al.* . Valproic acid induces caspase 3-mediated apoptosis in microglial cells. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, p. 1149-56, 2006.

DRECHSEL, D. A.; PATEL, M. Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 44, n. 11, p. 1873-86, 2008.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Arch Biochem Biophys**, v. 82, n. 1, p. 70-7, 1959.

ERREA, O. *et al.* . The disruption of mitochondrial axonal transport is an early event in neuroinflammation. **J Neuroinflammation**, v. 12, p. 152, 2015.

ESPOSITO, E. *et al.* . Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 205, n. 2, p. 295-312, 2007.

FARKAS, E. *et al.* . Pathological features of cerebral cortical capillaries are doubled in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 100, n. 4, p. 395-402, 2000.

FEINSTEIN, D. L. *et al.* . Nitric oxide synthase expression in glial cells: suppression by tyrosine kinase inhibitors. **J Neurochem**, v. 62, n. 2, p. 811-4, 1994.

FISCHER, J. C. *et al.* . Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clin Chim Acta**, v. 153, n. 1, p. 23-36, 1985.

FLIERL, M. A. *et al.* . Mouse closed head injury model induced by a weight-drop device. **Nat Protoc**, v. 4, n. 9, p. 1328-37, 2009.

FLOYD, R. A. Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. **Free Radic Biol Med**, v. 26, n. 9-10, p. 1346-55, 1999.

FORNO, L. S. Neuropathology of Parkinson's disease. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 55, n. 3, p. 259-72, 1996.

FRANCO, R. *et al.* . Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease. **Chem Biol Interact**, v. 188, n. 2, p. 289-300, 2010.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2012, p. 428010, 2012.

GAO, H. M.; HONG, J. S. Why neurodegenerative diseases are progressive: uncontrolled inflammation drives disease progression. **Trends Immunol**, v. 29, n. 8, p. 357-65, 2008.

GAO, H. M. *et al.* . Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 23, n. 4, p. 1228-36, 2003a.

GAO, H. M. *et al.* . Microglial activation-mediated delayed and progressive degeneration of rat nigral dopaminergic neurons: relevance to Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 81, n. 6, p. 1285-97, 2002.

GAO, H. M. *et al.* . Synergistic dopaminergic neurotoxicity of MPTP and inflammogen lipopolysaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. **FASEB J**, v. 17, n. 13, p. 1957-9, 2003b.

GAO, H. M. *et al.* . Neuroinflammation and alpha-synuclein dysfunction potentiate each other, driving chronic progression of neurodegeneration in a mouse model of Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. 807-14, 2011.

GEORGE, J. M. The synucleins. **Genome Biol**, v. 3, n. 1, p. REVIEWS3002, 2002.

GLEZER, I.; RIVEST, S. Glucocorticoids: protectors of the brain during innate immune responses. **Neuroscientist**, v. 10, n. 6, p. 538-52, 2004.

GRAEBER, M. B.; LI, W.; RODRIGUEZ, M. L. Role of microglia in CNS inflammation. **FEBS Lett**, v. 585, n. 23, p. 3798-805, 2011.

GUARDIA-LAGUARTA, C. *et al.* . alpha-Synuclein is localized to mitochondria-associated ER membranes. **J Neurosci**, v. 34, n. 1, p. 249-59, 2014.

GUTTERIDGE, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clin Chem**, v. 41, n. 12 Pt 2, p. 1819-28, 1995.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. **Drugs Aging**, v. 18, n. 9, p. 685-716, 2001.

_____. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem Soc Trans**, v. 35, n. Pt 5, p. 1147-50, 2007.

HANCOCK, D. B. *et al.* . Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. **BMC Neurol**, v. 8, p. 6, 2008.

HAYLEY, S. The neuroimmune-neuroplasticity interface and brain pathology. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 419, 2014.

HAYLEY, S.; LITTELJOHN, D. Neuroplasticity and the next wave of antidepressant strategies. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 218, 2013.

HIRSCH, E. C.; HUNOT, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: a target for neuroprotection? **Lancet Neurol**, v. 8, n. 4, p. 382-97, 2009.

HIRSCH, E. C. *et al.* . Nondopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Adv Neurol**, v. 91, p. 29-37, 2003.

HOBAN, D. B. *et al.* . Further characterisation of the LPS model of Parkinson's disease: a comparison of intra-nigral and intra-striatal lipopolysaccharide administration on motor function, microgliosis and nigrostriatal neurodegeneration in the rat. **Brain Behav Immun**, v. 27, n. 1, p. 91-100, 2013.

HUNOT, S. *et al.* . FcepsilonRII/CD23 is expressed in Parkinson's disease and induces, in vitro, production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha in glial cells. **J Neurosci**, v. 19, n. 9, p. 3440-7, 1999.

IMAMURA, K. *et al.* . Distribution of major histocompatibility complex class II-positive microglia and cytokine profile of Parkinson's disease brains. **Acta Neuropathol**, v. 106, n. 6, p. 518-26, 2003.

INNAMORATO, N. G.; LASTRES-BECKER, I.; CUADRADO, A. Role of microglial redox balance in modulation of neuroinflammation. **Curr Opin Neurol**, v. 22, n. 3, p. 308-14, 2009.

IRIZARRY, M. C. *et al.* . Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 57, n. 4, p. 334-7, 1998.

IZUMI, Y. *et al.* . Endogenous dopamine is involved in the herbicide paraquat-induced dopaminergic cell death. **Toxicol Sci**, v. 139, n. 2, p. 466-78, 2014.

JACKSON-LEWIS, V.; BLESIA, J.; PRZEDBORSKI, S. Animal models of Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 18 Suppl 1, p. S183-5, 2012.

JAEGER, L. B. *et al.* . Lipopolysaccharide alters the blood-brain barrier transport of amyloid beta protein: a mechanism for inflammation in the progression of Alzheimer's disease. **Brain Behav Immun**, v. 23, n. 4, p. 507-17, 2009.

JENNER, P.; OLANOW, C. W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. **Neurology**, v. 47, n. 6 Suppl 3, p. S161-70, 1996.

JOHNSON, A. B. *et al.* . Temporal expression of IL-1beta protein and mRNA in the brain after systemic LPS injection is affected by age and estrogen. **J Neuroimmunol**, v. 174, n. 1-2, p. 82-91, 2006.

KALAITZAKIS, M. E. *et al.* . The dorsal motor nucleus of the vagus is not an obligatory trigger site of Parkinson's disease: a critical analysis of alpha-synuclein staging. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 34, n. 3, p. 284-95, 2008.

KAMEL, F. *et al.* . Pesticide exposure and self-reported Parkinson's disease in the agricultural health study. **Am J Epidemiol**, v. 165, n. 4, p. 364-74, 2007.

KANG, M. J.; GIL, S. J.; KOH, H. C. Paraquat induces alternation of the dopamine catabolic pathways and glutathione levels in the substantia nigra of mice. **Toxicol Lett**, v. 188, n. 2, p. 148-52, 2009.

KANG, M. J. *et al.* . Selective vulnerability of the striatal subregions of C57BL/6 mice to paraquat. **Toxicol Lett**, v. 195, n. 2-3, p. 127-34, 2010.

KEENEY, P. M. *et al.* . Parkinson's disease brain mitochondrial complex I has oxidatively damaged subunits and is functionally impaired and misassembled. **J Neurosci**, v. 26, n. 19, p. 5256-64, 2006.

KIM, W. G. *et al.* . Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **J Neurosci**, v. 20, n. 16, p. 6309-16, 2000.

KIM, Y. S.; JOH, T. H. Microglia, major player in the brain inflammation: their roles in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Exp Mol Med**, v. 38, n. 4, p. 333-47, 2006.

KIRSTEN, T. B. *et al.* . Prenatal LPS exposure reduces olfactory perception in neonatal and adult rats. **Physiol Behav**, v. 104, n. 3, p. 417-22, 2011.

KIRSTEN, T. B. *et al.* . Zinc prevents sickness behavior induced by lipopolysaccharides after a stress challenge in rats. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0120263, 2015.

KLINTWORTH, H.; GARDEN, G.; XIA, Z. Rotenone and paraquat do not directly activate microglia or induce inflammatory cytokine release. **Neurosci Lett**, v. 462, n. 1, p. 1-5, 2009.

KLINTWORTH, H. *et al.* . Activation of c-Jun N-terminal protein kinase is a common mechanism underlying paraquat- and rotenone-induced dopaminergic cell apoptosis. **Toxicol Sci**, v. 97, n. 1, p. 149-62, 2007.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: mechanisms and implications. **Trends Neurosci**, v. 25, n. 3, p. 154-9, 2002.

KOPRICH, J. B. *et al.* . Neuroinflammation mediated by IL-1beta increases susceptibility of dopamine neurons to degeneration in an animal model of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 8, 2008.

KORTEKAAS, R. *et al.* . Blood-brain barrier dysfunction in parkinsonian midbrain in vivo. **Ann Neurol**, v. 57, n. 2, p. 176-9, 2005.

KRISHNA, S.; DODD, C. A.; FILIPOV, N. M. Behavioral and monoamine perturbations in adult male mice with chronic inflammation induced by repeated peripheral lipopolysaccharide administration. **Behav Brain Res**, v. 302, p. 279-90, 2016.

KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I. *et al.* . Indomethacin protects against neurodegeneration caused by MPTP intoxication in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 2, n. 8, p. 1213-8, 2002.

LACROIX, S.; FEINSTEIN, D.; RIVEST, S. The bacterial endotoxin lipopolysaccharide has the ability to target the brain in upregulating its membrane CD14 receptor within specific cellular populations. **Brain Pathol**, v. 8, n. 4, p. 625-40, 1998.

LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Reactive oxygen species production by mitochondria. **Methods Mol Biol**, v. 554, p. 165-81, 2009.

LANG, A. E.; LOZANO, A. M. Parkinson's disease. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 339, n. 15, p. 1044-53, 1998.

LANG, C. H. *et al.* . Effects of toxic and nontoxic endotoxin derivatives on glucose kinetics. **Circ Shock**, v. 17, n. 4, p. 301-11, 1985.

LANGSTON, J. W. The Parkinson's complex: parkinsonism is just the tip of the iceberg. **Ann Neurol**, v. 59, n. 4, p. 591-6, 2006.

LANGSTON, J. W.; BALLARD, P. A., JR. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **N Engl J Med**, v. 309, n. 5, p. 310, 1983.

LATINI, A. *et al.* . Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Mol Genet Metab**, v. 86, n. 1-2, p. 188-99, 2005.

LAWSON, L. J. *et al.* . Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience**, v. 39, n. 1, p. 151-70, 1990.

LING, Z. *et al.* . In utero bacterial endotoxin exposure causes loss of tyrosine hydroxylase neurons in the postnatal rat midbrain. **Mov Disord**, v. 17, n. 1, p. 116-24, 2002.

LITTELJOHN, D. *et al.* . Interferon-gamma deficiency modifies the motor and co-morbid behavioral pathology and neurochemical changes provoked by the pesticide paraquat. **Neuroscience**, v. 164, n. 4, p. 1894-906, 2009.

LIU, B. Modulation of microglial pro-inflammatory and neurotoxic activity for the treatment of Parkinson's disease. **AAPS J**, v. 8, n. 3, p. E606-21, 2006.

LIU, B. *et al.* . Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. **J Neurochem**, v. 77, n. 1, p. 182-9, 2001.

LIU, M.; BING, G. Lipopolysaccharide animal models for Parkinson's disease. **Parkinsons Dis**, v. 2011, p. 327089, 2011.

LIU, Y. *et al.* . Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 5, p. 864-70, 2008.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nat Rev Neurosci**, v. 3, n. 12, p. 932-42, 2002.

- LOUVEAU, A. *et al.* . Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. **Nature**, v. 523, n. 7560, p. 337-41, 2015.
- LOWRY, O. H. *et al.* . Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.
- MACRAE, M.; KENKEL, W. M.; KENTNER, A. C. Social rejection following neonatal inflammation is mediated by olfactory scent cues. **Brain Behav Immun**, v. 49, p. 43-8, 2015.
- MANGANO, E. N.; HAYLEY, S. Inflammatory priming of the substantia nigra influences the impact of later paraquat exposure: Neuroimmune sensitization of neurodegeneration. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 9, p. 1361-78, 2009.
- MANGANO, E. N. *et al.* . Granulocyte macrophage-colony stimulating factor protects against substantia nigra dopaminergic cell loss in an environmental toxin model of Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 43, n. 1, p. 99-112, 2011.
- MCCORMACK, A. L. *et al.* . Role of oxidative stress in paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **J Neurochem**, v. 93, n. 4, p. 1030-7, 2005.
- MCCORMACK, A. L. *et al.* . Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. **Neurobiol Dis**, v. 10, n. 2, p. 119-27, 2002.
- MCGEER, E. G.; KLEGERIS, A.; MCGEER, P. L. Inflammation, the complement system and the diseases of aging. **Neurobiol Aging**, v. 26 Suppl 1, p. 94-7, 2005.
- MCGEER, E. G.; MCGEER, P. L. Neuroinflammation in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a field in its infancy. **J Alzheimers Dis**, v. 19, n. 1, p. 355-61, 2010.
- MCGEER, P. L. *et al.* . Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. **Neurology**, v. 38, n. 8, p. 1285-91, 1988.
- MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Inflammation and neurodegeneration in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 10 Suppl 1, p. S3-7, 2004a.
- _____. Inflammation and the degenerative diseases of aging. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1035, p. 104-16, 2004b.

MEDAWAR, P. B. Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. **Br J Exp Pathol**, v. 29, n. 1, p. 58-69, 1948.

MINAMI, T. *et al.* . Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 35-41, 1998.

MING, Z.; SAWICKI, G.; BEKAR, L. K. Acute systemic LPS-mediated inflammation induces lasting changes in mouse cortical neuromodulation and behavior. **Neurosci Lett**, v. 590, p. 96-100, 2015.

MOGI, M. *et al.* . Interleukin-1 beta, interleukin-6, epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha are elevated in the brain from parkinsonian patients. **Neurosci Lett**, v. 180, n. 2, p. 147-50, 1994a.

MOGI, M. *et al.* . Interleukin-2 but not basic fibroblast growth factor is elevated in parkinsonian brain. Short communication. **J Neural Transm**, v. 103, n. 8-9, p. 1077-81, 1996.

MOGI, M. *et al.* . Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. **Neurosci Lett**, v. 165, n. 1-2, p. 208-10, 1994b.

MOGI, M. *et al.* . Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. **J Neural Transm**, v. 107, n. 3, p. 335-41, 2000.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MULLER, A. *et al.* . Olfactory function in idiopathic Parkinson's disease (IPD): results from cross-sectional studies in IPD patients and long-term follow-up of de-novo IPD patients. **J Neural Transm**, v. 109, n. 5-6, p. 805-11, 2002.

MUNTANE, G. *et al.* . Phosphorylation of tau and alpha-synuclein in synaptic-enriched fractions of the frontal cortex in Alzheimer's disease, and in Parkinson's disease and related alpha-synucleinopathies. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 913-23, 2008.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, 2005.

NOH, H.; JEON, J.; SEO, H. Systemic injection of LPS induces region-specific neuroinflammation and mitochondrial dysfunction in normal mouse brain. **Neurochem Int**, v. 69, p. 35-40, 2014.

NONAKA, N.; SHIODA, S.; BANKS, W. A. Effect of lipopolysaccharide on the transport of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide across the blood-brain barrier. **Exp Neurol**, v. 191, n. 1, p. 137-44, 2005.

NOYCE, A. J. *et al.* . Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. **Ann Neurol**, v. 72, n. 6, p. 893-901, 2012.

OTA, A. *et al.* . Peripheral lipopolysaccharide administration affects the olfactory dopamine system in mice. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1148, p. 127-35, 2008.

PAPPAS, J. J. *et al.* . Allelic methylation bias of the RARB2 tumor suppressor gene promoter in cancer. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 47, n. 11, p. 978-93, 2008.

PATTEN, D. A. *et al.* . Reactive oxygen species: stuck in the middle of neurodegeneration. **J Alzheimers Dis**, v. 20 Suppl 2, p. S357-67, 2010.

PENG, J. *et al.* . The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. **J Biol Chem**, v. 279, n. 31, p. 32626-32, 2004.

PEZZOLI, G.; CEREDA, E. Exposure to pesticides or solvents and risk of Parkinson disease. **Neurology**, v. 80, n. 22, p. 2035-41, 2013.

POEWE, W. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Eur J Neurol**, v. 15 Suppl 1, p. 14-20, 2008.

PREDIGER, R. D. *et al.* . Single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice models early preclinical phase of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 17, n. 2, p. 114-29, 2010.

PREMKUMAR, A.; SIMANTOV, R. Mitochondrial voltage-dependent anion channel is involved in dopamine-induced apoptosis. **J Neurochem**, v. 82, n. 2, p. 345-52, 2002.

PRZEDBORSKI, S. *et al.* . The parkinsonian toxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a technical review of its utility and safety. **J Neurochem**, v. 76, n. 5, p. 1265-74, 2001.

PURISAI, M. G. *et al.* . Microglial activation as a priming event leading to paraquat-induced dopaminergic cell degeneration. **Neurobiol Dis**, v. 25, n. 2, p. 392-400, 2007.

QIN, L. *et al.* . Microglia enhance beta-amyloid peptide-induced toxicity in cortical and mesencephalic neurons by producing reactive oxygen species. **J Neurochem**, v. 83, n. 4, p. 973-83, 2002.

QIN, L. *et al.* . Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. **Glia**, v. 55, n. 5, p. 453-62, 2007.

RAMACHANDIRAN, S. *et al.* . Divergent mechanisms of paraquat, MPP+, and rotenone toxicity: oxidation of thioredoxin and caspase-3 activation. **Toxicol Sci**, v. 95, n. 1, p. 163-71, 2007.

RAPPOLD, P. M. *et al.* . Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 51, p. 20766-71, 2011.

RENTZOS, M. *et al.* . Circulating interleukin-15 and RANTES chemokine in Parkinson's disease. **Acta Neurol Scand**, v. 116, n. 6, p. 374-9, 2007.

RICHARDSON, J. R. *et al.* . Paraquat neurotoxicity is distinct from that of MPTP and rotenone. **Toxicol Sci**, v. 88, n. 1, p. 193-201, 2005.

RIVEST, S. Cannabinoids in microglia: a new trick for immune surveillance and neuroprotection. **Neuron**, v. 49, n. 1, p. 4-8, 2006.

RUANO, D. *et al.* . Role of p38 and inducible nitric oxide synthase in the in vivo dopaminergic cells' degeneration induced by inflammatory processes after lipopolysaccharide injection. **Neuroscience**, v. 140, n. 4, p. 1157-68, 2006.

SAMII, A.; NUTT, J. G.; RANSOM, B. R. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 363, n. 9423, p. 1783-93, 2004.

SANCHEZ-GUAJARDO, V. *et al.* . alpha-Synuclein vaccination prevents the accumulation of parkinson disease-like pathologic inclusions in striatum in association with regulatory T cell recruitment in a rat model. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 72, n. 7, p. 624-45, 2013.

SANCHEZ-PERNAUTE, R. *et al.* . Selective COX-2 inhibition prevents progressive dopamine neuron degeneration in a rat model of Parkinson's disease. **J Neuroinflammation**, v. 1, n. 1, p. 6, 2004.

SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDES-FERRER, S. I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 28, 2015.

SCHAPIRA, A. H. Causes of neuronal death in Parkinson's disease. **Adv Neurol**, v. 86, p. 155-62, 2001.

SCHULZ-SCHAEFFER, W. J. The synaptic pathology of alpha-synuclein aggregation in dementia with Lewy bodies, Parkinson's disease and Parkinson's disease dementia. **Acta Neuropathol**, v. 120, n. 2, p. 131-43, 2010.

SCHWARZBOLD, M. L. *et al.* . Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice. **J Neurotrauma**, v. 27, n. 10, p. 1883-93, 2010.

SHIMIZU, K. *et al.* . Carrier-mediated processes in blood--brain barrier penetration and neural uptake of paraquat. **Brain Res**, v. 906, n. 1-2, p. 135-42, 2001.

SHIMOJIMA, N. *et al.* . Altered expression of zonula occludens-2 precedes increased blood-brain barrier permeability in a murine model of fulminant hepatic failure. **J Invest Surg**, v. 21, n. 3, p. 101-8, 2008.

SOARES, W.; MORO, S.; ALMEIDA, R. M. Rural workers' health and productivity: an economic assessment of pesticide use in Minas Gerais, Brazil. **Appl Health Econ Health Policy**, v. 1, n. 3, p. 157-64, 2002.

SOKRAB, T. E. *et al.* . A transient hypertensive opening of the blood-brain barrier can lead to brain damage. Extravasation of serum proteins and cellular changes in rats subjected to aortic compression. **Acta Neuropathol**, v. 75, n. 6, p. 557-65, 1988.

SPILLANTINI, M. G. *et al.* . alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 11, p. 6469-73, 1998.

STEINMAN, L. Elaborate interactions between the immune and nervous systems. **Nat Immunol**, v. 5, n. 6, p. 575-81, 2004.

STOLP, H. B.; DZIEGIELEWSKA, K. M. Review: Role of developmental inflammation and blood-brain barrier dysfunction in neurodevelopmental and neurodegenerative diseases. **Neuropathol Appl Neurobiol**, v. 35, n. 2, p. 132-46, 2009.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 335-76, 2003.

TANNER, C. M.; GOLDMAN, S. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Neurol Clin**, v. 14, n. 2, p. 317-35, 1996.

TANNER, C. M. *et al.* . Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease. **Environ Health Perspect**, v. 119, n. 6, p. 866-72, 2011.

TANSEY, M. G.; GOLDBERG, M. S. Neuroinflammation in Parkinson's disease: its role in neuronal death and implications for therapeutic intervention. **Neurobiol Dis**, v. 37, n. 3, p. 510-8, 2010.

TAYLOR, J. M.; MAIN, B. S.; CRACK, P. J. Neuroinflammation and oxidative stress: co-conspirators in the pathology of Parkinson's disease. **Neurochem Int**, v. 62, n. 5, p. 803-19, 2013.

TAYLOR, T. N. *et al.* . Nonmotor symptoms of Parkinson's disease revealed in an animal model with reduced monoamine storage capacity. **J Neurosci**, v. 29, n. 25, p. 8103-13, 2009.

TEISMANN, P.; SCHULZ, J. B. Cellular pathology of Parkinson's disease: astrocytes, microglia and inflammation. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 149-61, 2004.

THIRUCHELVAM, M. *et al.* . Developmental exposure to the pesticides paraquat and maneb and the Parkinson's disease phenotype. **Neurotoxicology**, v. 23, n. 4-5, p. 621-33, 2002.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**, v. 552, n. Pt 2, p. 335-44, 2003.

VESZELKA, S. *et al.* . Human serum amyloid P component attenuates the bacterial lipopolysaccharide-induced increase in blood-brain barrier permeability in mice. **Neurosci Lett**, v. 352, n. 1, p. 57-60, 2003.

WATANABE, Y.; KATO, H.; ARAKI, T. Protective action of neuronal nitric oxide synthase inhibitor in the MPTP mouse model of Parkinson's disease. **Metab Brain Dis**, v. 23, n. 1, p. 51-69, 2008.

WEISS, N. *et al.* . The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. **Biochim Biophys Acta**, v. 1788, n. 4, p. 842-57, 2009.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol**, v. 77, p. 325-33, 1981.

WIRDEFELDT, K. *et al.* . Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. **Eur J Epidemiol**, v. 26 Suppl 1, p. S1-58, 2011.

XAIO, H. *et al.* . Effect of LPS on the permeability of the blood-brain barrier to insulin. **Brain Res**, v. 896, n. 1-2, p. 36-42, 2001.

YANO, M. *et al.* . Short-term exposure of high glucose concentration induces generation of reactive oxygen species in endothelial cells: implication for the oxidative stress associated with postprandial hyperglycemia. **Redox Rep**, v. 9, n. 2, p. 111-6, 2004.

YU, W. *et al.* . The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. **Hum Mol Genet**, v. 20, n. 16, p. 3227-40, 2011.

ZECCA, L. *et al.* . Human neuromelanin induces neuroinflammation and neurodegeneration in the rat substantia nigra: implications for Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 116, n. 1, p. 47-55, 2008.

ZHANG, W. *et al.* . Aggregated alpha-synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **FASEB J**, v. 19, n. 6, p. 533-42, 2005.

ZHOU, F. *et al.* . Iptakalim alleviates rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons through inhibiting microglia-mediated neuroinflammation. **Neuropsychopharmacology**, v. 32, n. 12, p. 2570-80, 2007.

ZLOKOVIC, B. V. *et al.* . Low-density lipoprotein receptor-related protein-1: a serial clearance homeostatic mechanism controlling Alzheimer's amyloid beta-peptide elimination from the brain. **J Neurochem**, v. 115, n. 5, p. 1077-89, 2010.