



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

KATIANE ROVERSI

**MECANISMOS MOLECULARES DA DOR NA DOENÇA DE  
PARKINSON: EVIDÊNCIAS OBTIDAS EM MODELOS  
EXPERIMENTAIS**

FLORIANÓPOLIS  
2019

Katiane Roversi

MECANISMOS MOLECULARES DA DOR NA DOENÇA DE PARKINSON:  
EVIDÊNCIAS OBTIDAS EM MODELOS EXPERIMENTAIS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da  
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em  
Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel Prediger  
Coorientadora: Profa Dra. Alexandra Latini

Florianópolis  
2019

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

Roversi, Katiane

Mecanismos moleculares da dor na doença de  
Parkinson: evidências obtidas em modelos  
experimentais / Katiane Roversi ; orientador, Rui  
Daniel Prediger, coorientadora, Alexandra Latini,  
2019.

91 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3.  
Nocicepção. 4. MPTP intranasal. I. Prediger, Rui  
Daniel . II. Latini, Alexandra . III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Farmacologia. IV. Título.

Katiane Roversi

**Mecanismos moleculares da dor na doença de Parkinson: evidências obtidas em modelos experimentais**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Sébastien Talbot  
Université de Montréal

Profa. Dra Marilise Escobar Burger  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Marcelo Farina  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Fernando Spiller  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmacologia.

---

Prof. Dr. Rui Daniel Prediger  
Coordenador do Programa

---

Prof. Dr. Rui Daniel Prediger  
Orientador

Florianópolis, 29 de Agosto de 2019.

Este trabalho é dedicado às minhas  
irmãs: Karine, Karoline e Francini.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Adecir, por ter confiado em mim e por ter me concedido a oportunidade de estar aqui neste momento. Também às minhas irmãs Karoline, Francini e em especial a Karine, que mesmo de longe, sempre está do meu lado em todos os momentos. À minha mãezinha querida Josalete, a qual acompanha espiritualmente cada passo da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Prediger, pela oportunidade de realizar esse trabalho sob sua dedicada orientação, por todos os ensinamentos, pela paciência, disponibilidade, e por ter contribuído para meu crescimento nesses anos de doutorado.

À Professora Dra Alexandra Latini, que abriu as portas de seu laboratório e auxiliou na execução desse trabalho, sempre com seus sábios conselhos. Obrigada também por ter auxiliado no meu processo do doutorado sanduíche.

Ao Professor Dr. Sebastien Talbot, meu orientador no período sanduíche, por ter aberto as portas do seu lab, por toda oportunidade de discussão científica e toda a contribuição para meu trabalho e minha carreira.

Aos queridos amigos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON) pela amizade, conhecimento compartilhado, boas risadas e agradável convivência durante estes quatro anos.

Aos meus colegas do Talbot Lab, pela excelente convivência durante os 6 meses juntos, por todo conhecimento compartilhado. Meu período de sanduíche não teria sido tão proveitoso se não fosse vocês.

Ao Professor Juliano Ferreira e seus alunos Dra. Raquel e Dr. Sérgio por toda ajuda para o início do desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Dr. Anicleto Poli pelo auxílio na execução dos experimentos com cromatografia.

À Dra. Débora Scheffer, pelo auxílio com os experimentos de cromatografia e expressão gênica.

Aos professores Dr. Fernando Spiller, Dr. Marcelo Farina, Dra. Marilise Burger, Dr Sebastien Talbot, Dr. Alfeu Zanotto pelo aceite em avaliar meu trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia que contribuíram com seus ensinamentos para a minha formação científica.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia, em especial Ana Luiza, Daniel Patricio, Geison, Flora, Tuane e Lucilene, pela amizade em todos os momentos.

À minha amiga Rachel por todo apoio e amizade, em especial durante o período do doutorado sanduíche.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da Pós-graduação.

À minha psicóloga e amiga Ana, por me entender como ninguém.

Aos funcionários do LAMEB, por todo auxílio e atenção.

Ao CNPq, pelos recursos financeiros, bem como à CAPES e CNPq pelas bolsas de estudos concedida.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realização deste curso.

Enfim, agradeço a todas as pessoas que me incentivaram e que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem  
foram conquistadas do que parecia impossível.”*

Charles Chaplin

## RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a uma doença neurodegenerativa caracterizada pela perda progressiva dos neurônios dopaminérgicos da substância negra *pars compacta* (SNpc), a consequente redução nos níveis de dopamina (DA) no estriado e aparecimento dos sintomas motores da doença. Além destes sintomas clássicos, os pacientes também podem ser acometidos por sintomas não motores, os quais podem inclusive preceder os sintomas motores em muitos anos. A dor está entre um dos mais frequentes sintomas não motores na DP e, mais recentemente, vem sendo reconhecida como uma das principais causas que afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Contudo, apesar da relevância clínica, trata-se de um sintoma muitas vezes negligenciado, especialmente por conta do seu mecanismo ainda pouco compreendido, fato que contribui efetivamente para a falta de manejo sintomático adequado na terapêutica da DP. Assim, é clara a necessidade de estudos que permitam elucidar este sintoma, de maneira especial nas fases iniciais da doença, pois uma melhor compreensão poderá ter um impacto positivo na identificação de sinais para um diagnóstico precoce, além de um tratamento mais efetivo para a DP. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar as alterações nociceptivas em um modelo animal da DP, utilizando a administração intranasal (i.n.) da neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), bem como investigar os mecanismos envolvidos e uma possível estratégia terapêutica. Como resultados, foi encontrado que a administração i.n. de MPTP induz hipersensibilidade a estímulos térmicos (calor) e mecânicos, independentemente da presença dos sintomas motores clássicos. Com relação aos mecanismos envolvidos, foram encontradas evidências de modificações nos três níveis de processamento da dor: supraespinal, medula espinal e em nociceptores. A nível supraespinal, foi visualizado um possível papel da DA, uma vez que se encontrou uma significativa neurodegeneração dopaminérgica na via nigroestriatal concomitante com o surgimento de alterações nociceptivas; além do que, a reposição de DA com um precursor de sua síntese foi capaz de reverter as modificações comportamentais frente aos estímulos dolorosos. Já na medula espinal, ao se avaliar os níveis de neurotransmissores envolvidos com a via descendente da dor, não foram vistas alterações dopaminérgicas (noradrenérgica e/ou serotoninérgica de forma persistente). Quanto aos nociceptores, o MPTP i.n. induziu alterações oxidativas mitocondriais em gânglios da raiz dorsal (DRG), além de degeneração seguida por infiltração de células imunes e aumento nos níveis de interleucina 1 $\beta$ , alterações que ocorreram juntamente com a visualização da hipersensibilidade nociceptiva. Ademais, a administração de MPTP i.n. parece estar relacionada a um aumento na produção de tetrahidrobiopterina (BH4), sendo a inibição da síntese deste cofator capaz de reverter os comportamentos associados a hipersensibilidade térmica e mecânica previamente evidenciados, de maneira que o

deslumbre de manipulações sobre essa via como modo de controle da dor na DP deve proceder de investigações adicionais. Em conclusão, foi demonstrado o modelo de administração intranasal do MPTP como uma ferramenta útil para estudar a dor em fases iniciais da DP e, a partir disto, pode-se inferir que estímulos sensoriais anormais decorrentes de danos nos nociceptores e alterações dopaminérgicas a nível de sistema nervoso central contribuam diretamente para o prejuízo no processamento nociceptivo existente na DP.

**Palavras-chave:** Doença de Parkinson. Nocicepção. MPTP intranasal.

## ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons of substantia nigra pars compacta (SNpc), reduction of dopamine (DA) in the striatum and the appearance of the cardinal motor symptoms. Besides the cardinal symptoms, PD patients can present a huge variety of non-motor symptoms, which may even precede motor symptoms by many years. Pain is one of the most prominent non-motor symptoms observed in PD patients and has been recognized as one of the main causes that negatively affect their quality of life. Nevertheless, it is a symptom often neglected, especially because its mechanism still poorly understood; This fact contributes to the absence of adequate symptomatic management in PD therapy. Thus, there is a clear need for studies to elucidate this symptom, especially in the early stages of the disease, as a better understanding may have a positive impact on the signs' identification for early diagnosis, as well as a more effective treatment for PD. Thereby, the present study aimed to evaluate the nociceptive alterations followed by the intranasal (i.n.) administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine (MPTP), an animal model of PD, as well as investigate the mechanisms involved and a possible therapeutic strategy. The i.n. administration of MPTP induced hypersensitivity to thermal (heat) and mechanical stimuli, regardless of the presence of classic motor symptoms. Concerning the mechanisms involved, we found evidence of alterations in the three levels of pain processing: supraspinal, spinal and nociceptors. At the supraspinal level, it was found a possible involvement of DA, since it has been shown dopaminergic neurodegeneration in the nigrostriatal pathway concomitant with the nociceptive alterations. Also, the treatment with a dopaminergic precursor was able to reverse the behavior alterations. In the spinal cord, when measuring the levels of the neurotransmitters involved with the descending pain pathway, no dopaminergic changes (neither noradrenergic nor serotonergic alterations were persistently seen). In the nociceptors, i.n. MPTP induced mitochondrial oxidative changes in dorsal root ganglia (DRG) in addition to degeneration followed by infiltration of immune cells with increased interleukin-1b levels, alterations that occurred concomitantly with the nociceptive hypersensitivity. Besides, the i.n. administration of MPTP seems to be related to an increase in tetrahydrobiopterin (BH4) production, and the inhibition of this cofactor synthesis can reverse the behaviors associated with thermal and mechanical hypersensitivity previously evidenced, so that the manipulation dazle over this pathway as a way of controlling PD pain, should be further investigated. In conclusion, it was demonstrated the i.n. MPTP administration as a useful animal model to study pain in the early stages of PD and, from this, we may affirm that abnormal sensory stimuli resulting from nociceptor damage and dopaminergic alterations at the central nervous system level contribute directly for PD pain.

**Keywords:** Parkinson's disease. Nociception. Intranasal MPTP.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Vias neuronais afetadas na doença de Parkinson.....	17
<b>Figura 2.</b> Progressão da doença de Parkinson. ....	18
<b>Figura 3.</b> Nocicepção na DP.....	24
<b>Figura 4.</b> Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre as respostas nociceptivas de ratos avaliadas nos testes do von Frey, placa quente e acetona nos dias 7, 14 e 21.....	49
<b>Figura 5.</b> Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre a respostas nociceptivas induzidas pela injeção intraplantar de capsaicina.....	50
<b>Figura 6.</b> Efeito da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre a nocicepção avaliada nos dias 7, 14 e 21.. ....	51
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre diferentes parâmetros de locomoção em ratos.....	52
<b>Figura 8.</b> Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre degeneração dopaminérgica na via nigroestriatal em ratos.. ....	53
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração L-DOPA, um precursor dopaminérgico, sobre a hipersensibilidade ao calor e estímulo mecânico induzido pela administração intranasal de MPTP em ratos.....	54
<b>Figura 10.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o conteúdo de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) na medula espinhal..	55
<b>Figura 11.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunocontéudo da enzima tirosina hidroxilase em medula espinhal.....	56
<b>Figura 12.</b> Mapa de calor representativo dos níveis de expressão dos transcritos de genes de proteínas envolvidas com o mecanismo de toxicidade do MPTP em DRG de camundongos.....	58
<b>Figura 13.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre a geração de ânion superóxido em neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos, 6 h após sua administração.. ....	59
<b>Figura 14.</b> Avaliação da participação do transportador de dopamina no mecanismo de toxicidade induzida pelo MPP <sup>+</sup> nos neurônios do gânglio da raiz dorsal.....	60
<b>Figura 15.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunocontéudo da enzima tirosina hidroxilase e do receptor dopaminérgico D1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos. ....	62
<b>Figura 16.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre o RNA mensageiro da enzima tirosina hidroxilase (TH), em neurônios do gânglio da raiz dorsal.. ....	62
<b>Figura 17.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre a infiltração de neutrófilos e monócitos em neurônios do gânglio da raiz dorsal.. ....	63
<b>Figura 18.</b> Efeito da depleção de neutrófilos/monócitos sobre a alodinia mecânica induzida pela administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) em camundongos..	64
<b>Figura 19.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunocontéudo da interleucina 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ) (A), da enzima GTP-ciclohdroxilase I	

(GTPCH I) (B), e o RNA mensageiro para a enzima sepiapterina redutase (SR) (C) em gânglios da raiz dorsal de ratos.. .....	65
<b>Figura 20.</b> Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre o RNA mensageiro do receptor de interleucina 1 tipo 1, em neurônios do DRG de camundongos.....	66
<b>Figura 21.</b> Efeito da administração de sulfassalazina (SSZ), inibidor da síntese de BH4, sobre a hipersensibilidade ao calor e estímulo mecânico induzido pela administração intranasal de MPTP em ratos.. .....	67

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1.</b> Sumário das principais publicações investigando alterações nociceptivas em modelos animais da DP induzidos por neurotoxinas. ....	30
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA: 6-hidroxi-dopamina  
ANOVA: análise de variância  
ATP: trifosfato de adenosina (do Inglês: *adenosine triphosphate*)  
BH4: 5,6,7,8-tetrahidrobiopterina  
CEUA: Comissão de Ética para o uso de animais  
DA: dopamina  
DAT: transportador de dopamina (do Inglês: *dopamine transporter*)  
DMEM: do inglês: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*  
DOPAC: ácido 3,4-diidroxifenilacético  
DP: doença de Parkinson  
DRG: gânglio da raiz dorsal (do inglês: *dorsal root ganglion*)  
EPM: Erro padrão da média  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
GDNF: fator neurotrófico derivado da glia  
GPi: globo pálido interno  
GPe: globo pálido externo  
Gr-1: receptor de granulócito tipo 1  
GTPCH1: GTP-ciclohidroxilase I  
HLA-DR: do inglês: human leukocyte antigen),  
IL: interleucina  
IFN- $\gamma$ : interferon- $\gamma$   
i.n.: intranasal  
i.p.: intraperitoneal  
L-DOPA: L-diidroxifenilalanina  
MAOB: monoamina oxidase B  
MPP+: 1-metil-4-fenilpiperidina  
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina  
NMDA: N-metil-D-aspartato  
NST: núcleo subtalâmico  
PGE2: prostaglandina E2  
mRNA: RNA mensageiro  
SR: sepiapterina redutase ,  
SN: substância negra  
SNP: sistema nervoso periférico  
SNpc: parte compacta da substância negra  
SNpr: parte reticulada da substância negra  
SSZ: sulfassalazina  
TH: tirosina hidroxilase  
TNF: fator de necrose tumoral (do Inglês: *Tumor Necrosis Fator*)  
v.o.: via oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
1.1	Doença de Parkinson: epidemiologia, etiopatogenia e sintomas	15
1.2	Neurobiologia da dor na DP	20
1.3	Modelos animais para estudo da doença de Parkinson	27
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos específicos	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1	Animais	33
4.1.1.	Ratos wistar	33
4.1.2.	Camundongos C57BL/6J	33
4.2	Experimentos <i>in vivo</i>	33
4.2.1	Protocolos experimentais	33
4.2.2	Administração intranasal de MPTP	38
4.2.3	Avaliações comportamentais	39
4.3	Análises <i>ex vivo</i>	42
4.4	Experimentos em culturas de neurônios de gânglios da raiz dorsal	47
4.4.1.	Culturas de neurônios do DRG	47
4.4.2.	Determinação do potencial de membrana mitocondrial	47
4.5	Perfil de expressão gênica	48
4.6	Análise estatística	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>49</b>
5.1	Caracterização das respostas nociceptivas após a administração intranasal de MPTP em roedores	49
5.2	Avaliação dos efeitos da administração intranasal de MPTP sobre atividade locomotora e a via dopaminérgica nigro-estriatal	51
5.3	Avaliação dos mecanismos envolvidos com as respostas nociceptivas induzidas pelo MPTP: ênfase alterações na medula espinhal	55
5.4	Avaliação dos mecanismos envolvidos nas alterações nociceptivas induzidas pelo MPTP: ênfase nas alterações em gânglio da raiz dorsal	57
5.5	Proposta de uma possível intervenção terapêutica	66
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>SUMÁRIO DE RESULTADOS</b>	<b>78</b>
<b>8</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença de Parkinson: epidemiologia, etiopatogenia e sintomas (ênfase na dor)

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa com mais casos no mundo, ficando atrás somente da doença de Alzheimer. Dados recentes mostraram que a DP acomete mais de 6 milhões de pessoas no mundo (PRINGSHEIM et al., 2014; GBD 2016 PARKINSON'S DISEASE, 2018). A incidência e prevalência aumentam com o avanço da idade, atingindo cerca de 1% da população com mais de 65 anos e em torno de 4% da população com mais de 80 anos (CONNOLLY; LANG, 2014). Considerando que o envelhecimento populacional e o fato do envelhecimento representar um dos principais fatores de risco para a DP, é esperado que o número de diagnósticos possa dobrar nos próximos 20 anos, atingindo mais de 14 milhões de pessoas em 2040 (DORSEY; BLOEM, 2018).

A DP foi primeiramente descrita há cerca de 200 anos, quando o médico inglês James Parkinson publicou um documento, intitulado “Ensaio da Paralisia Agitante”, onde descrevia os sintomas motores de seis casos clínicos. Desde então, a DP foi e vem sendo alvo de estudo de muitos grupos de pesquisa. A principal característica neuropatológica da DP, a qual foi hipotetizada primeiramente por Edouard Briassaud em 1895, e posteriormente confirmada por Constantin Trétiakoff, é a perda de neurônios dopaminérgicos na substantia nigra (SN) pars compacta, os quais enviam projeções para os núcleos da base, resultando na redução dos níveis de dopamina (DA) no estriado (LOTHARIUS; BRUNDIN, 2002; SURMEIER et al., 2011). Essa morte neuronal é acompanhada pela formação de inclusões proteicas intraneurais denominadas corpos de Lewy, compostas principalmente pelo acúmulo das proteínas  $\alpha$ -sinucleína e ubiquitina (STEFANIS, 2012; YASUDA; NAKATA; MOCHIZUKI, 2013). Estes acúmulos podem surgir devido a falhas nos mecanismos de degradação proteica, como a autofagia e o sistema ubiquitina proteossoma (UPS, do Inglês: Ubiquitin-Proteasome System) (SPILLANTINI et al., 1997; BLANDINI et al., 2000).

Enquanto as alterações patológicas estão bem descritas, os fatores que desencadeiam o processo neurodegenerativo ainda não estão completamente esclarecidos (PRZEDBORSKI, 2017). Para os casos hereditários da DP, a doença é basicamente desencadeada devido a mutações em genes que codificam proteínas reguladoras da função mitocondrial como Parkina,  $\alpha$ -sinucleína, LRRK2 (do inglês: Leucine-rich repeat kinase 2), PINK1 (PTEN-induced kinase1) e VPS35 (vacuolar protein sorting 35). Já para os casos idiopáticos, acredita-se que os mesmos sejam desencadeados por uma série de fatores, desde ambientais a genéticos, o que a caracteriza como uma doença de causa multifatorial. Recentemente, foi proposto que a etiologia e também a progressão da DP poderia ser dividida em três pontos ou fases:

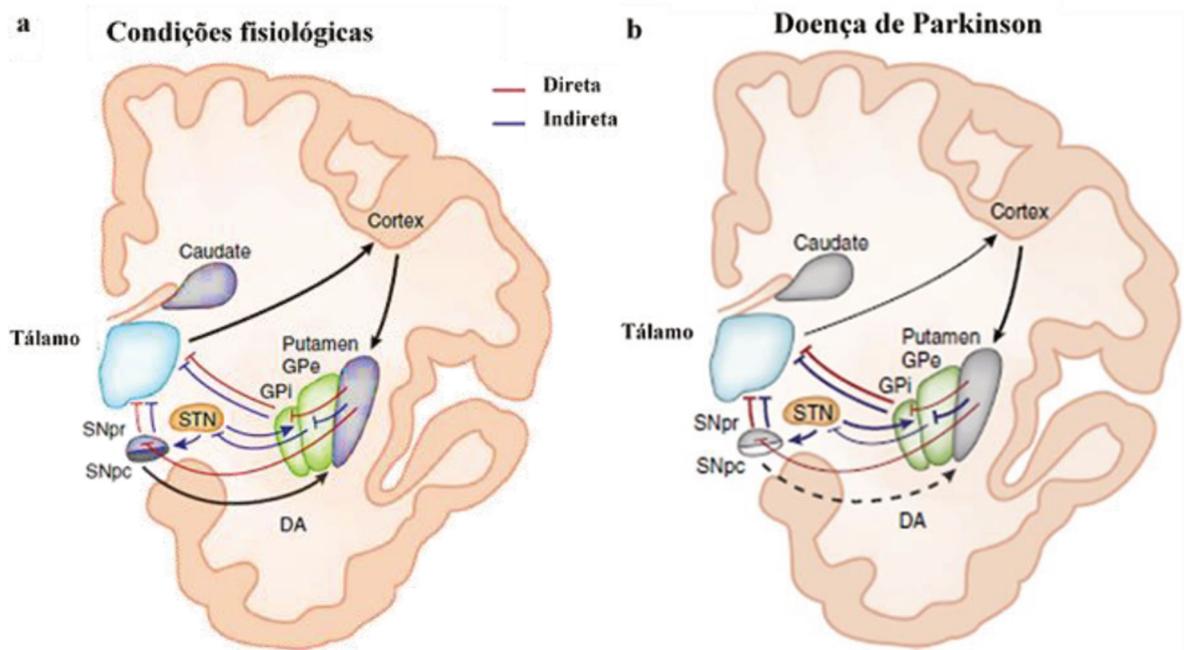
i) gatilhos ou iniciadores; ii) facilitadores; e iii) agravantes. Durante a primeira fase, os “gatilhos”, como infecções virais ou toxinas ambientais, provocam o processo da doença no cérebro e/ou nos tecidos periféricos. Os desencadeadores sozinhos, no entanto, podem ser insuficientes, exigindo que “facilitadores”, como a inflamação periférica, estejam presentes para que a completa patologia da DP se desenvolva. Após manifestada a doença, os “agravantes”, como déficit na autofagia, estimulam a neurodegeneração e exacerbam a progressão da doença (JOHNSON et al., 2019).

Com relação aos mecanismos associados com a morte neuronal, sabe-se que a DP atinge vários sistemas de neurotransmissão e também envolve diversos mecanismos moleculares intra e extracelulares, que muitas vezes estão interligados por vias de toxicidade semelhantes. Alguns exemplos são alterações celulares que envolvem múltiplas vias e mecanismos tais como: função mitocondrial, homeostase proteica da  $\alpha$ -sinucleína, estresse oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação (DORSEY et al., 2007).

Os sintomas motores clássicos, necessários para o diagnóstico clínico da DP, são a bradicinesia, rigidez muscular e tremores de repouso (RODRIGUEZ-OROZ et al., 2009; DEMAAGD; PHILIP, 2015), os quais são decorrentes principalmente da degeneração dos neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. Esses sintomas motores se manifestam quando a degeneração alcança níveis superiores a 70% (BRAAK et al., 2004; GALVAN; WICHMANN, 2008). Um modelo bem estabelecido para explicar os prejuízos motores presentes na DP sustenta que a depleção de DA resulte em mudanças na plasticidade de neurônios estriatais. Estas alterações provocariam um desequilíbrio na atividade de vias neuroanatômicas que se projetam, através de outros núcleos, para estruturas de saída dos núcleos da base (ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986; ALEXANDER; CRUTCHER, 1990; GRAYBIEL et al., 1994).

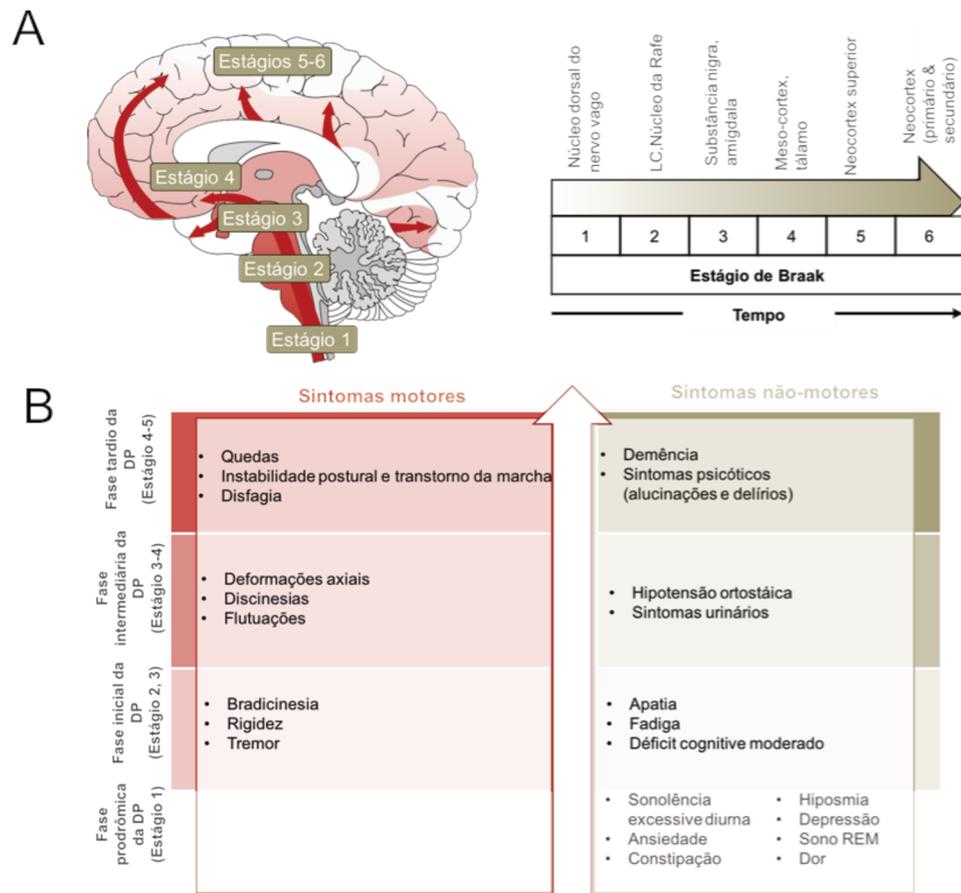
O conjunto de núcleos basais é formado por estruturas do mesencéfalo como o corpo estriado (núcleos caudado e putâmen), globo pálido (segmento interno e externo – GPi e GPe, respectivamente), núcleo subtalâmico (NST), e substância negra (parte reticulada e parte compacta – SNpr e SNpc, respectivamente); juntamente com outras regiões do cérebro, incluindo o córtex cerebral, tálamo, e diversos núcleos do tronco cerebral (ALEXANDER; DELONG; STRICK, 1986; ALEXANDER; CRUTCHER, 1990; GRAYBIEL et al., 1994). De acordo com este modelo (figura 1), a ativação cortical induz a liberação de glutamato que ativa neurônios espinhais médios (MSNs) estriatais que se projetam, especialmente, para o GPi e SNpr (representando a via direta). Esta população neuronal caracteriza-se por serem células GABAérgicas; assim, elas exercem uma ação inibitória sobre os neurônios do GPi e SNpr, que também são GABAérgicos. A inibição da SNpr leva a uma desinibição dos neurônios glutamatérgicos do tálamo, que recebem aferências da SNpr e se projetam para o córtex. O resultado comportamental desta cadeia de eventos é de estimulação dos movimentos. Por outro lado, a ativação de MSNs estriato-palidais, que se projetam para a SNpr indiretamente através do GPe e NST (via indireta), inibe os neurônios gabaérgicos do GPe, que conduz a uma desinibição de neurônios glutamatérgicos do NST. O aumento da liberação de glutamato desses neurônios excitatórios NST por

sua vez, ativa os neurônios GABAérgicos da SNpr que se projetam para o tálamo, resultando na redução da atividade locomotora e movimentos (para revisão ver: CALABRESI et al., 2014).



**Figura 1.** Vias neuronais afetadas na doença de Parkinson. (a) representação das vias em condições normais. (b) representação das vias alteradas na doença de Parkinson. Legenda: GPI: Globo pálido interno; GPe: Globo pálido externo; SNpc: Substância negra parte compacta; SNpr: Substância negra parte reticulada, NST: núcleo subtalâmico (modificado de CALABRESI et al., 2014).

No entanto, sabe-se que o processo neurodegenerativo se inicia muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores e pode afetar outras regiões cerebrais, além da via nigroestriatal, como bulbo olfatório, núcleo dorsal da rafe, *locus coeruleus*, córtex cerebral, hipocampo entre outras, e também acomete diversos sistemas de neurotransmissão (BRAAK et al., 2004). A deposição dos corpos de Lewy em diferentes regiões foi relacionada com a progressão dos sintomas da doença. Esse princípio de distribuição dos agregados de  $\alpha$ -sinucleína é parte importante da hipótese de Braak, que propõe um esquema de progressão desde a fase prodrômica da DP, dividido em seis estágios (figura 2). Essas fases de progressão explicariam o aparecimento dos sintomas não motores da DP, como distúrbios autonômicos, perda do olfato, depressão, distúrbios do sono, déficit cognitivo, demência e alterações sensoriais (KHOO et al., 2013; revisado por PFEIFFER, 2016).



**Figura 2.** Progressão da doença de Parkinson. (A) O processo de progressão da doença de Parkinson de acordo com BRAAK, 2003. (B) Aparecimento dos sintomas no decorrer da progressão da DP. Adaptado de POEWE et al. 2017 e BRAAK et al. 2004. Abreviaturas: LC: Locus coeruleus.

Um sintoma não motor que se destaca pela sua alta prevalência é a dor, que atinge aproximadamente 60-85% dos pacientes com a DP, variando de acordo com o estudo epidemiológico (BEISKE et al., 2009; POLITIS et al., 2010; SILVERDALE et al., 2018). Além da grande prevalência, a dor é apontada pelos pacientes como um dos sintomas que mais afetam negativamente sua qualidade de vida, tanto nas fases precoces quanto nas fases mais avançadas da doença (POLITIS et al., 2010; SKORVANEK et al., 2018). A dor também pode contribuir ou agravar outros sintomas da DP, como a depressão e os distúrbios do sono (SANTOS-GARCÍA et al., 2011).

Na DP, os pacientes podem apresentar diferentes tipos de dores agudas ou crônicas. A dor do tipo músculo-esquelética, considerada dor nociceptiva, pode surgir como consequência secundária dos sintomas motores, como rigidez e anormalidade postural, ou de comorbidades, como osteoartrose (ALLEN et al., 2016). A dor também pode se manifestar de maneira primária, ou seja, independente dos sintomas motores, em 25-64% dos pacientes (LEE et al., 2006; DEFAZIO et al., 2008; NÈGRE-PAGÈS et al., 2008), apresentando características típicas de disfunção neuropática, dor causada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial, podendo ser de

origem periférica, como a dor radicular, ou central (BLANCHET; BREFEL-COURBON, 2018). Por fim, este sintoma pode ocorrer bilateralmente, afetando principalmente as extremidades, ou acometer o hemisfério com maior comprometimento motor (EHRT; LARSEN; AARSLAND, 2009; MADDEN; HALL, 2010). De encontro a isso, estudos prévios têm evidenciado que a dor pode frequentemente preceder os sintomas motores da DP. James Charcot, em 1877, já descreveu que o Parkinsonismo poderia ser precedido por dores do tipo neurálgicas ou reumatoides. Um dos primeiros estudos clínicos que demonstrou a dor como uma alteração pré-motora foi realizado por Snider e colaboradores em 1976. Os autores descreveram que 9% dos pacientes do estudo apresentaram alterações sensoriais antes de desenvolver as alterações motoras clássicas da DP (SNIDER et al., 1976). De maneira interessante, Lin e colaboradores mostraram, em um estudo de coorte, que pacientes com dor apresentam um aumento no risco de desenvolver DP quando comparado com pacientes sem dor, apresentando inclusive uma relação entre a severidade da dor e a incidência da DP (LIN et al., 2013). Neste sentido, a dor pode preceder o surgimento dos sintomas motores da DP em vários anos em até 1/3 dos pacientes (HA; JANKOVIC, 2012; SKOGAR et al., 2012). Adicionalmente, essa alteração não motora observada no início da doença afeta a qualidade de vida dos pacientes, aumentando a relevância do estudos das suas bases neurobiológicas e opções terapêuticas mais eficazes (BAIG et al., 2015).

Juntamente com esses tipos de dores espontâneas, os pacientes apresentam alteração no limiar à dor, que é o ponto ou o momento em que um dado estímulo é reconhecido como doloroso. Uma recente revisão avaliou os achados de 19 estudos, com um total de 616 pacientes com DP e 451 controles, e destes, 15 estudos mostraram redução nos limiares à dor nos pacientes com DP, onde a hiperalgesia frente à estímulos térmicos e mecânicos foi mais consistente entre os diferentes estudos, enquanto a sensibilidade ao frio apresentou maiores variações entre os estudos (SUNG et al., 2018). Em destaque, já foi demonstrado que pacientes nas fases iniciais da DP já apresentam alteração de limiar ao frio e ao calor (DJALDETTI et al., 2004; BREFEL-COURBON et al., 2005; SCHESTATSKY et al., 2007; MYLIUS et al., 2009).

Apesar da relevância clínica, a dor na DP é muitas vezes negligenciada e, especialmente nas fases iniciais da DP, a dor crônica é muitas vezes mal diagnosticada, podendo ser diagnosticada como artrite ou dor ciática (SCHRAG et al., 2015). Portanto, sua fisiopatologia e etiologia permanecem pouco compreendidas, e existe uma carência de fármacos específicos e eficazes para o alívio da dor na DP (WASNER; DEUSCHL, 2012).

Com relação ao tratamento, estudos clínicos têm demonstrado que fármacos com ação dopaminérgica, como o pramipexol (agonista de receptores dopaminérgicos) e L-DOPA (precursor de DA), podem ser eficazes no alívio da dor na DP (GERDELAT-MAS et al., 2007; BARONE et al., 2010). No entanto, outros estudos não encontraram essa mesma relação, e foi demonstrado que aproximadamente 40% dos pacientes não relatam melhora na dor após o tratamento com fármacos dopaminérgico (DEFAZIO et al., 2008; TINAZZI et al., 2010; THE APDA NATIONAL YOUNG ONSET CENTER, SPRING, 2011). Além disso, vem surgindo uma série de

evidências de que a sobrecarga de DA periférica causada pelo tratamento com L-DOPA poderia contribuir para o desenvolvimento de neuropatias sensoriais e autonômicas (DEVIGILI et al., 2016; NOLANO et al., 2017). Outras estratégias analgésicas podem ser fornecidas aos pacientes, como antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), analgésicos, opioides e antidepressivos. Em destaque, um estudo clínico demonstrou que 65% dos pacientes apresentam melhora da dor crônica utilizando duloxetine, um inibidor da recaptção de serotonina e noradrenalina (DJALDETTI et al., 2007). Por fim, aproximadamente  $\frac{1}{4}$  dos pacientes parkinsonianos fazem uso de algum analgésico, sendo que o paracetamol é um dos mais utilizados, mas em torno de  $\frac{2}{3}$  destes não relatam melhora do quadro de dor (SKOGAR et al., 2012).

## 1.2 Neurobiologia da dor na DP

Considerando a DP como uma doença neurodegenerativa que atinge diferentes áreas do SNC e sistemas de neurotransmissão, é esperado que diferentes fases do processamento da dor podem ser afetadas nos pacientes, que vai desde a transmissão de estruturas periféricas aos centros superiores até a sua recepção e interpretação (figura 3). A transmissão nociceptiva se inicia na periferia com a ativação de nociceptores, segue pelas fibras sensoriais de forma ortodrômica passando pelo gânglio da raiz dorsal (DRG, abreviatura do inglês: *dorsal root ganglion*) e alcançando o corno dorsal da medula espinhal, onde faz conexão com neurônios de segunda ordem que ascendem o sinal para áreas supraespinhais, onde o sinal nociceptivo é processado e reconhecido como dor (BASBAUM et al., 2009) (para revisão ver: MYLIUS et al., 2009).

No sistema nervoso periférico (SNP), os nociceptores, que são terminações nervosas livres de fibras aferentes primárias capazes de perceber estímulos potencialmente nocivos. Esses nociceptores podem ser encontrados em dois tipos de fibras: fibras A $\delta$  e as fibras C (BASBAUM et al., 2009). As fibras A $\delta$  apresentam neurônios que respondem à estímulos mecânicos e químicos, mas que apresentam um alto limiar de ativação para estímulos térmicos. Por outro lado, essas fibras possuem outra população de neurônios que ativadas por estímulos térmicos, mas que apresentam um alto limiar para ativação por estímulos mecânicos. Já as fibras C apresentam populações de neurônios que respondem aos estímulos nocivos de diferentes naturezas, como mecânico, térmico e químico, de maneira mais lenta do que as fibras A $\delta$ , devido à ausência de mielinização. Esses neurônios, classificados como pseudounipolares, apresentam seu corpo celular inserido nos DRG, uma estrutura que reúne milhares de corpos celulares que ficam inseridos próximos à medula espinhal, mas pertencente ao SNP (BASBAUM et al., 2009).

Os corpos celulares dos neurônios do DRG são cobertos com projeções pericárdicas que aumentam a área de superfície e apresentam função de sintetizar e transportar substâncias necessárias para o funcionamento correto do neurônio,

incluindo receptores, canais iônicos e moléculas importantes para a transmissão sináptica (DEVOR, 1999; BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). Após alguma lesão, os nociceptores podem apresentar alterações moleculares, como regulação positiva da expressão de receptores de estímulos nocivos e também o recrutamento de populações de nociceptores normalmente silenciosos. Isto pode resultar em aumento da sensibilidade dos neurônios nociceptivos, com o desenvolvimento de atividade espontânea e exacerbada e, conseqüentemente, dor espontânea e hiperalgesia (BERTA et al., 2017).

É conhecido que neurônios sensoriais são particularmente vulneráveis a alterações no sistema ubiquitina-proteossoma, déficits mitocondriais e inflamação, que como já mencionado, são alterações associadas com o mecanismo de dano neuronal observado na DP. De fato, estudos em pacientes com a DP demonstram a presença de danos em fibras sensoriais do tipo C (pequeno diâmetro) (PODGORNY et al., 2016; NOLANO et al., 2017; JEZIORSKA et al., 2019) e também de grande diâmetro (NOLANO et al., 2017). Além disso, acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína em nervos cutâneos autonômicos e sensoriais e na pele já foram encontrados em pacientes com a DP, ainda nas fases iniciais da doença (WANG et al., 2013; DONADIO et al., 2014; RODRÍGUEZ-LEYVA et al., 2014). Em conjunto, estes estudos demonstram que fibras sensoriais podem ser afetadas na DP, inclusive já nas fases iniciais. Ainda, um estudo em população envelhecida demonstrou a presença de  $\alpha$ -sinucleína no DRG e na medula espinhal (SUMIKURA et al., 2015), confirmando que essas regiões podem ser alvos iniciais de acúmulo de  $\alpha$ -sinucleína. Apesar de todas as evidências sobre danos a nível de neurônios sensoriais, o fenótipo associado com estas alterações ainda não está bem compreendido. Enquanto Chen e colaboradores demonstraram a relação entre alterações em fibras sensoriais do tipo A $\delta$  e a presença de dor (CHEN et al., 2015), Podgorny e colaboradores observaram que a degeneração em fibras de pequeno diâmetro está associada a uma diminuição na percepção da vibração (PODGORNY et al., 2016). Nolano e colaboradores encontraram uma diminuição na densidade de fibras sensoriais, acompanhadas com maiores limiares para estímulos mecânicos e calor (NOLANO et al., 2017).

Em relação a DA em neurônios sensoriais, estudos têm demonstrado que seus níveis no DRG podem servir para ajustar a sensibilidade dos nociceptores a estímulos nocivos (GALBAVY et al., 2013). Estudos *in vitro* indicaram que a DA pode reduzir a corrente de canais de sódio resistentes à tetrodotoxina (TTX-R) expressos em neurônios do DRG de pequeno diâmetro por meio do seu receptor D1 (GALBAVY et al., 2013). Quanto a distribuição dos receptores dopaminérgicos, foi observado que a expressão dos receptores dopaminérgicos D1 e D5 ocorre exclusivamente em neurônios de menor diâmetro, enquanto que os receptores D2 não são encontrados (GALBAVY et al., 2013). Além da presença de receptores dopaminérgicos, sabe-se que cerca de 15% de todos os neurônios adultos do DRG expressam a enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante na síntese das catecolaminas (BRUMOVSKY; VILLAR; HÖKFELT, 2006; USOSKIN et al., 2015; ALBISETTI et al., 2017), corroborando a hipótese de que no DRG pode ocorrer a produção e liberação de DA (CHAKRABORTY et al., 2016). Quanto a presença de outros componentes do sistema

dopaminérgico, como o transportador de dopamina (DAT) em neurônios no DRG, os estudos mostram resultados controversos (BRUMOVSKY; VILLAR; HÖKFELT, 2006; USOSKIN et al., 2015).

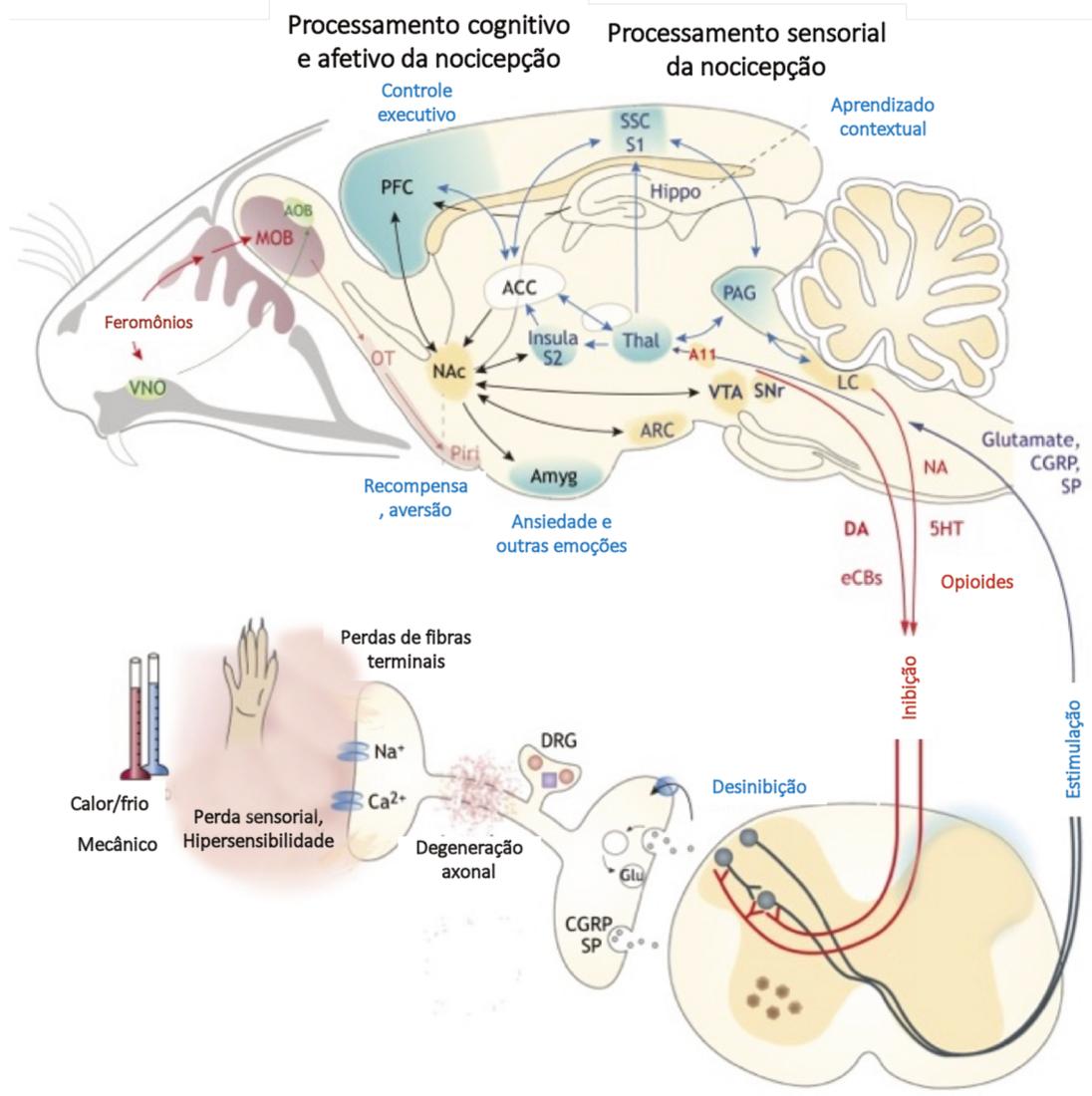
Com relação ao estudo das vias nociceptivas em modelos animais da DP, pouco ainda se sabe sobre alterações patológicas em neurônios sensoriais. Um estudo na literatura, utilizando o modelo animal da DP induzido com a administração intraperitoneal (i.p.) de 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP) em camundongos C57BL/6J, encontrou um aumento da expressão gênica de canais de sódio Nav1.1, Nav1.7, Nav1.9, e diminuição na expressão gênica dos subtipos Nav1.8 e Nav1.6 diretamente no DRG da porção lombar da medula espinhal de camundongos, concomitante com o aparecimento de hiperalgesia (DING et al., 2012). Além disso, a administração pela via subcutânea de reserpina, uma droga que induz depleção de monoaminas, induziu redução no número de fibras nociceptivas do tipo C, concomitantemente com um aumento da resposta das fibras remanescentes, o que parece contribuir para a hiperalgesia mecânica observada em ratos tratados com reserpina (TAGUCHI et al., 2015). Esses estudos demonstram que a administração de drogas monoaminérgicas, amplamente utilizadas para indução de danos a nível de SNC, também são capazes de induzir alterações em estruturas do sistema nervoso somatossensorial, e que isso poderia contribuir para o desenvolvimento das alterações nociceptivas observadas. Entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos com as respostas nociceptivas, tanto nos modelos animais, quanto nos pacientes com a DP, ainda necessitam ser elucidados.

A nível central do processamento da dor, os axônios dos neurônios sensoriais também se projetam para o corno dorsal da medula espinhal, onde interagem com os neurônios de segunda ordem. Estes neurônios de segunda ordem medeiam a transmissão das informações nociceptivas por meio do envio de projeções para diversas estruturas encefálicas, para que as mesmas sejam então processadas e interpretadas, possibilitando a caracterização, qualificação, localização e assimilação cognitiva-emocional do estímulo doloroso. No encéfalo, a dor é processada por vias neurais que envolvem o sistema lateral e medial. O primeiro é constituído pelo trato espinotalâmico que passa através do tálamo lateral e se projeta para áreas corticossensoriais e está envolvido no processamento da discriminação sensorial, localização e intensidade da dor. Já o sistema medial da dor processa principalmente o componente afetivo-emocional da dor e se projeta através do núcleo talâmico medial para áreas associadas com a emoção e a cognição. Além dessas vias de processamento ascendente da dor, uma via chamada de descendente ou sistema modulador, a qual se origina no tronco encefálico e estruturas cerebrais, desempenha um papel importante na modulação da informação nociceptiva na medula espinhal. Os sistemas de neurotransmissão serotoninérgicos, noradrenérgico e dopaminérgico são os principais componentes dessa via descendente da dor (para revisão ver: JULIUS e BASBAUM, 2001).

A via dopaminérgica nigroestriatal, região classicamente alterada na DP, tem um papel importante no processamento da dor. Estudos utilizando tomografia com emissão de positron em indivíduos saudáveis sugerem um aumento na liberação de

DA após a estimulação dolorosa utilizando calor. Isso sugere que um aumento da atividade da DA pode estar associado com uma menor sensação de dor (PERTOVAARA et al., 2004). Apesar de efeitos diretos ainda não serem estabelecidos, sabe-se que vias eferentes da SN estabelecem conexão com áreas relacionadas aos aspectos afetivos e motivacionais da dor, como córtex préfrontal, núcleo central da amígdala, córtex cingulado, núcleo intralaminar do tálamo, e também para lâmina V do corno dorsal medula espinhal (BURKEY; CARSTENS; JASMIN, 1999).

Alterações no componente sensorial da dor também podem ocorrer na DP. Um dos mecanismos que podem explicar o envolvimento dessa via dopaminérgica com a dor, seria que a desnervação do sistema nigrostriatal leva a um aumento da atividade neuronal no NST, GPi e na SNpr, o que pode levar a inibição da região talâmica lateral, afetando os mecanismos de processamento da dor por desinibição das vias mediais espinotalâmico-corticais para o córtex cingulado anterior, e também por inibição da localização redutora do tálamo lateral, um dos elementos de discriminação sensorial da dor (CRAIG, 1998). Todos esses achados sugerem que nos pacientes com a DP a função anormal dos núcleos da base modula a dor pelo aumento ou diminuição da propagação do sinal nociceptivo, e pela influência afetiva e cognitiva, interferindo na forma como o paciente experimenta e interpreta os sinais nociceptivos e a dor (TRUINI; FRONTONI; CRUCCU, 2013).



**Figura 3.** Nocicepção na DP. Figura baseada em um cérebro de roedor. O processamento sensorial da nocicepção envolve neurônios nociceptivos primários no gânglio da raiz dorsal (DRG), neurônios secundários de projeção no corno dorsal da medula espinal, no tálamo dorsolateral e no córtex somatossensorial (SSC, S1). Esse caminho direto conecta-se ao córtex pré-frontal (PFC), córtex ínsula e sistema límbico - amígdala (Amyg), córtex cingulado anterior (ACC), núcleo accumbens (NAc), áreas do córtex mesencéfalo (como a área tegmental ventral (VTA); substância cinzenta periaquedutal (PAG) e hipocampo. Essas áreas processam a modulação cognitiva e afetiva da dor e são necessárias para sentir a recompensa associada ao alívio da dor. Esta recompensa do alívio da dor é baseada na projeção de DA no NAc. Além disso, as vias de inibição da dor surgem do mesencéfalo e sinalizam para o corno dorsal da medula espinal. Embora os neurônios da VTA sejam menos vulneráveis na DP, disfunções nessas vias de recompensas e da inibição da dor provavelmente contribuem para a dor associada à DP. Degeneração axonal e perdas de fibras terminais nos neurônios sensitivos primários também parecem contribuir com as alterações nociceptivas na DP. (modificado de VALEK; AUBURGER; TEGEDER, 2019).

### 1.2.1. Alterações inflamatórias na DP: ênfase no seu papel na fisiopatologia da dor

Diversos estudos vêm evidenciando o papel importante de mecanismos de inflamação no desenvolvimento da DP. Alterações imunes são conhecidas por envolver tanto células imunes do SNC e da periferia, por ocorrer precocemente, e por influenciar a progressão da doença (para revisão ver: TANSEY; ROMERO-RAMOS, 2019). É conhecido que tanto o sistema imune inato, responsável por resposta de defesa não específicas, como o sistema imune adquirido, associado a respostas imunes específicas, apresentam funções na DP (para revisão ver: KANNARKAT; BOSS; TANSEY, 2013). Alterações no sistema imune inato, são demonstradas pela ativação de microglia e aumento de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF) e as interleucinas  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) e IL-6 em modelos animais e também em pacientes com a DP (GERHARD et al., 2006; TANSEY; MCCOY; FRANK-CANNON, 2007; BARTELS et al., 2010). Por outro lado, o envolvimento da imunidade adquirida é demonstrado pela infiltração de células T no parênquima cerebral de diversos modelos da DP, como em camundongos que receberam a administração de MPTP bem como em pacientes parkinsonianos (BROCHARD et al., 2008; para revisão ver : LEVITE, 2016). No modelo animal da DP induzido pela administração da neurotoxina MPTP, Brochard e colaboradores demonstraram que a remoção de células T do tipo CD4<sup>+</sup> reduz a morte de DA na via nigroestriatal. Estes dados evidenciam a importância da ativação do sistema imune para o processo neurodegenerativo (BROCHARD et al., 2009).

Além do envolvimento direto com os mecanismos de neurodegeneração, também é conhecida a relação entre o perfil imunológico com o aparecimento de alguns sintomas da doença, como capacidade cognitiva, depressão e distúrbios do sono (REALE; GREIG; KAMAL, 2009; MENZA et al., 2010; SCALZO et al., 2010). De fato, estudos de fase prodrômica da DP mostram que processos inflamatórios estão presentes também nas fases iniciais da doença, em tecidos do sistema olfatório e intestino, regiões acometidas em estágios iniciais da DP. Em destaque, recentemente um estudo em ratos administrados com a toxina 6-OHDA demonstrou a influência da sinalização de citocinas no processamento central da hiperalgesia na substância cinzenta periaquedutal de ratos (ZHUANG et al., 2016). Além disso, um estudo comparou o perfil de expressão de citocinas por células imunes no sangue. Enquanto não foram observadas diferenças entre os pacientes com dor e sem dor nos níveis de HLA-DR (do inglês: human leukocyte antigen), TNF, IL-6 e IL-10 na população de monócitos, linfócitos totais ou T CD4<sup>+</sup>, o grupo de pacientes da DP com dor apresentaram uma menor expressão dessas mesmas citocinas na população de neutrófilos, além de uma menor razão IL-6/IL-10 e maior razão TNF/IL-10 no grupo com dor nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, respectivamente. O perfil imunológico avaliado através da expressão de HLA-DR, TNF, IL-6 e IL-10 sinaliza uma resposta imunológica distinta na presença da dor em indivíduos com a DP (SANTOS, 2017).

Neste contexto, é bem estabelecido que o sistema imune tem um papel importante na fisiopatologia de quadros de dor (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2010). De fato, a proximidade física entre nociceptores e células imunes, particularmente nos tecidos periféricos, possibilita a interação entre estes dois sistemas, tanto em estados de dor aguda, como crônica (REN; DUBNER, 2010; GRACE et al., 2014). Tem sido amplamente demonstrado o papel de macrófagos, monócitos e neutrófilos em quadros de dor. Estas células produzem citocinas inflamatórias  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8 e IL-17 que podem ativar diretamente os nociceptores, ou estimular a produção e liberação de outros mediadores inflamatórios, como a PGE2. Por sua vez, os neuropeptídeos liberados localmente pelos nociceptores podem mediar o influxo e a polarização dessas células imunes, levando a um ciclo inflamatório que pode acarretar na cronicidade da dor (LOTZ; CARSON; VAUGHAN, 1987; SCHUH et al., 2014; KRUSTEV; RIOUX; MCDUGALL, 2015; KOBAYASHI et al., 2016; TREVISAN et al., 2016). De encontro a isso, estudos prévios da literatura já associaram condições de dor crônica com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, ressaltando a importância das mesmas nos processos de dor (PERKINS; TRACEY, 2000; LUCHTING et al., 2015).

### 1.2.2. Envolvimento da 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (BH4) com a dor e a DP

Uma série de estudos vêm demonstrando uma relação entre a 5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (BH4) e processos de dor crônica, tanto neuropática quanto inflamatória (COSTIGAN; LATREMOLIERE; WOOLF, 2012; LATREMOLIERE et al., 2015). A BH4 é cofator obrigatório para a síntese de fenilalanina hidroxilase, TH e triptofano hidroxilase (KAUFMAN, 1963), e também de todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (WERNER; BLAU; THÖNY, 2011). Em relação à regulação da biossíntese do cofator BH4, o principal ponto de controle é a GTP-ciclohidroxilase I (GTPCH I) e a expressão desta enzima pode ser modulada positivamente por citocinas pró-inflamatórias. As citocinas, tais como o interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e a IL-1 $\beta$ , ou uma combinação destas com o TNF, induzem a expressão do gene que codifica para GTPCH I *in vitro* e *in vivo* em várias células incluindo monócitos, macrófagos e células dendríticas da linhagem monocítica (DALE et al., 2009; HAGBERG et al., 2010).

Estudos demonstraram que as enzimas GTPCH e sepiapterina redutase (SR), relacionadas com a síntese da BH4, encontram-se reguladas positivamente em neurônios do gânglio da raiz dorsal após a lesão do nervo ciático em roedores, ocasionando o aumento na produção de BH4 (COSTIGAN et al., 2002; LATREMOLIERE et al., 2015). Por outro lado, Tegeder e colaboradores demonstraram a existência de um haplótipo protetor no gene GTPCH1 que aumenta o limiar para a dor. Os portadores deste haplótipo, em torno de 20% da população de estudo com lesão de nervos periféricos, apresentaram menor expressão e atividade enzimática da GTPCH, portanto, menor produção de BH4, e maior limiar à dor

(TEGEDER et al., 2006). Os mecanismos pelos quais a BH4 pode estar induzindo aumento na nocicepção ainda não estão completamente elucidados, mas estudos apontam que esta resposta está associada a um aumento na produção de óxido nítrico (LATREMOLIERE et al., 2015), sendo que este pode diminuir (via nitrosilação) o limiar de ativação de canais TRPV1 e TRPA1 (MIYAMOTO et al., 2009), promovendo um aumento no influxo de cálcio nos neurônios sensoriais.

Além disso, já foi demonstrado o envolvimento da BH4 com a DP. Estudos clínicos descreveram uma diminuição nos níveis de BH4 plasmática que possivelmente acompanha a progressão da doença (ICHINOSE et al., 2013). No entanto, nenhum estudo em pacientes foi realizado em fases mais iniciais da DP. Algumas evidências a partir de estudos experimentais têm demonstrado que nas fases mais iniciais da indução, pode ser observado um aumento na síntese de BH4 no estriado após administração intraestriatal de ferro (ARYAL et al., 2014). Devido ao fato de a BH4 ser cofator da principal enzima responsável pela síntese da DA, esse aumento poderia ser um mecanismo de compensação para aumentar os níveis de TH nos neurônios remanescentes na DP. Apesar destas evidências da participação da BH4 na modulação da nocicepção e na DP, até o momento nenhum estudo investigou o papel desta via na dor associada à DP.

### **1.3 Modelos animais para estudo da doença de Parkinson**

A grande prevalência e o impacto negativo que a dor causa na qualidade de vida dos pacientes com a DP, bem como a falta de entendimento dos mecanismos envolvidos nesse sintoma, demonstram a necessidade do desenvolvimento de estudos que permitam elucidar esse sintoma. Além disso, visto que a dor pode ser uma característica pré-motora comum da DP, os estudos com esse sintoma inicial podem facilitar tanto a identificação quanto o correto manejo no curso inicial da doença.

Entretanto, o desenvolvimento de estudos clínicos apresenta dificuldades de execução, além de serem considerados subjetivos e limitados por dificuldades em se desenvolver estudos mais aprofundados, recorrendo-se, portanto, ao uso de modelos animais para o estudo da dor, principalmente em roedores (MOGIL, 2009). Sabe-se que os modelos animais são ferramentas úteis para o estudo de mecanismos envolvidos em doenças humanas. Apesar de nenhum dos modelos atualmente utilizados ser capaz de mimetizar completamente a DP, modelos genéticos ou induzidos por neurotoxinas como a 6-hidroxidopamina (6-OHDA), rotenona e MPTP vêm sendo utilizados para auxiliar no melhor entendimento da doença. Apesar da grande maioria dos modelos animais priorizar a mimetização da sintomatologia motora clássica da DP (PETROSKE et al., 2001; BEZARD; GROSS; BROTHIE, 2003; ROUSSELET et al., 2003; BEZARD, 2008; GIBRAT et al., 2009), nos últimos anos vêm aumentando o interesse nos modelos que mimetizam também as alterações não motoras, em especial as que se manifestam nas fases mais iniciais da DP. Focaremos

nas descrições mais detalhadas a respeito do modelo da administração intranasal (i.n.) do MPTP, por ser o utilizado na parte experimental deste estudo.

O MPTP foi identificado no início dos anos 1980, quando um grupo de dependentes de heroína na faixa etária dos 20-35 anos foi hospitalizado com imobilidade corporal na Califórnia (EUA). O neurologista William Langston diagnosticou estes pacientes como parkinsonismo, que foi posteriormente confirmado pela eficácia do tratamento com a L-DOPA e posterior análise post-mortem. Foi identificado que a substância que os jovens utilizaram foi contaminada com um produto secundário da síntese do 1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina (MPPP), o MPTP (LANGSTON et al., 1983). Essa observação indicou de maneira pioneira que elementos ambientais poderiam atuar como desencadeantes da DP. Desde então, o MPTP vêm sendo utilizado como a principal ferramenta para a indução de parkinsonismo em animais de laboratório (roedores e primatas não humanos) (para revisão ver: LANGSTON, 2017)

O MPTP é uma neurotoxina que atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e, posteriormente, é oxidado pela enzima monoamina oxidase B (MAO-B) em astrócitos e neurônios serotoninérgicos, dando origem ao íon 1-metil-4-fenil piperidínio ( $MPP^+$ ), o qual é captado pelo DAT para o interior dos neurônios dopaminérgicos. No interior do neurônio, o  $MPP^+$  concentra-se principalmente na mitocôndria, onde tem a capacidade de inibir o complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. Essa inibição acarreta na redução da produção de adenosina trifosfato (ATP) e no aumento da formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs). Esses eventos promovem danos ao DNA, oxidação de proteínas, peroxidação lipídica de membranas celulares, desbalanço de cálcio e, conseqüentemente, dano e morte celular (PASQUALI; CALDARAZZO-IENCO; FORNAI, 2014).

Um modelo que vem ganhando destaque pela sua habilidade em induzir os sintomas iniciais da DP é a administração da neurotoxina MPTP pela via i.n. (PREDIGER et al., 2011). Já a administração i.n. do MPTP leva ao desenvolvimento de sintomas não motores como prejuízo olfatório, cognitivo e emocional (PREDIGER et al., 2006, 2010; CASTRO et al., 2012) em ratos e camundongos. O aparecimento das alterações se assemelha parcialmente com o estagiamento descrito por Braak (BRAAK et al., 2004), ocorrendo antes das alterações motoras, o que reforça a utilidade do modelo para o estudo das alterações não motoras precoces da DP (para revisão ver: PREDIGER et al., 2011; SAMPAIO et al., 2017).

Modelos animais utilizando roedores também podem ser utilizados para o estudo de mecanismos fisiopatológicos da dor (MOGIL, 2009). Assim como para outras alterações comportamentais estudadas em modelos animais, existem limitações quanto à quantificação adequada das respostas comportamentais que podem ser consideradas equivalentes à dor em humanos. A dor em si não é possível de ser mensurada diretamente nos roedores, o que faz com que sejam utilizados métodos que quantificam comportamentos que, de forma indireta, indiquem respostas nociceptivas. A maioria dos testes utilizados são estimados a partir da avaliação da resposta a um estímulo nocivo, que geralmente é aplicado externamente, podendo

ser elétrico, térmico, mecânico ou químico. Essas respostas geralmente indicam o comportamento de hiperalgesia ou alodínia, que podem ser verificados a partir da aplicação dos filamentos de Von-Frey na pata do animal, e dos testes Randall-Selitto e de Hargreaves (BARROT, 2012; Para revisão ver: DEUIS; DVORAKOVA; VETTER, 2017).

Diversos trabalhos utilizando modelos animais da DP induzidos com as neurotoxinas MPTP ou 6-OHDA foram realizados, principalmente na última década, com o intuito de estudar a dor associada à DP. A tabela 1 sumariza os principais trabalhos da literatura e seus achados mais relevantes. Os dados obtidos a partir destes estudos demonstram que a hipersensibilidade observada na DP pode ser observada também em modelos animais desta doença. A administração de 6-OHDA em diferentes doses e regiões encefálicas, como SN, feixe prosencefálico medial e estriado, induz a diminuição nos limiares de retirada da pata no teste de Von-Frey e da placa quente (WANG et al., 2017; ZHUANG et al., 2016). Apenas dois trabalhos utilizando a administração i.p. da neurotoxina MPTP demonstraram o desenvolvimento de hiperalgesia a estímulos térmicos e mecânicos em camundongos (DING et al., 2012; PARK et al., 2015). No entanto, em todos estes estudos utilizando as neurotoxinas 6-OHDA e MPTP, os animais desenvolvem as alterações nociceptivas concomitantemente ou após as alterações motoras, fato que dificulta a diferenciação entre a nocicepção secundária aos déficits motores ou que seja decorrente de alterações primárias da doença. Além disso, a presença de comprometimentos motores podem ser um viés para a interpretação dos resultados dos testes comportamentais que são utilizados, pois o desempenho nos testes que avaliam a nocicepção dependem, na maioria dos casos, do movimento do animal.

**Tabela 1.** Sumário das principais publicações investigando alterações nociceptivas em modelos animais da DP induzidos por neurotoxinas.

<b>Modelo</b>	<b>Espécie animal</b>	<b>Comportamentos- Nocicepção</b>	<b>Autor</b>
6-OHDA (estriado/ bilateral/ 10 µg)	Ratos wistar	4 semanas: Diminuição nos limiares no von Frey e no teste plantar na pata;	Cao et al. 2016
6-OHDA (estriado/ unilateral/ 20 µg)	Ratos Wistar	6 semanas: maior resposta à formalina apenas quando administrada na pata ipsilateral.	Tassorelli et al., 2007.
6-OHDA (SNpc/bilateral/5.1 µg)	Ratos Sprague-dawley	A partir de 4 dias: alodínia mecânica na face;	Dieb et al., 2013
6-OHDA (SNpc/ unilateral/ 20 µg)	Ratos Wistar	Diminuição nos limiares no von Frey (1 semana após), no teste da acetona na pata (2 semanas após)	Gomez-Paz et al., 2018.
6-OHDA (MFB/ unilateral/14 µg)	Ratos Sprague-dawley	Diminuição nos limiares no von Frey e placa quente na pata	Zhuang et al. 2016.
6-OHDA (SNpc/ bilateral/16 µg)	Ratos Wistar	2 a 4 semanas: diminuição nos limiares no von Frey e placa quente na pata;	Wang et al., 2017.
MPTP (i.p./ 20 mg/kg,4x em intervalos de 2h)	Camundongos C57BL/N	Maior resposta no von Frey, placa quente e <i>tail flick</i> ;	Park et al., 2015.
MPTP (i.p./11 mg/kg durante 5 dias)	Camundongos C57BL/6N	Aumento de resposta na placa quente e <i>tail flick</i> ;	Ding et al., 2012,

Abreviaturas: 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; i.p.: intraperitoneal; MFB: Feixe prosencefálico medial; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina.

## 2 JUSTIFICATIVA

As informações apresentadas até aqui mostram que a DP é uma doença bastante complexa, que envolve diversos fatores que ainda não estão totalmente esclarecidos. Dentre esses fatores se destaca a dor, um dos sintomas não motores mais frequentes da DP, relatada como um dos fatores que mais afetam negativamente a qualidade de vida os pacientes. Apesar da relevância clínica, é um sintoma muitas vezes negligenciado, principalmente por conta do seu mecanismo pouco compreendido, fato que também justifica a falta de um tratamento eficaz para muitos pacientes. Diante do exposto, existe uma necessidade de estudos que permitam elucidar os mecanismos moleculares desse sintoma, de maneira especial nas fases pré-motoras/iniciais, pois uma melhor compreensão da mesma pode facilitar tanto na identificação quanto no correto manejo no curso inicial da doença. Neste sentido, o presente estudo propõe uma ferramenta para o estudo das alterações nociceptivas associadas às fases iniciais da DP, buscando um avanço no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesse sintoma. Por fim, considerando as evidências do envolvimento da BH4 na modulação de respostas nociceptivas e na DP, buscamos investigar o papel desta via na dor associada à DP.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar mecanismos envolvidos com alterações nociceptivas associadas às fases iniciais da doença de Parkinson à nocicepção, utilizando o modelo animal induzido pela administração intranasal de MPTP.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre respostas nociceptivas em roedores;
- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a função motora, a degeneração da via dopaminérgica nigro-estriatal, bem como o efeito da reposição dopaminérgica sobre as alterações nociceptivas em roedores;
- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre os níveis de monoaminas, imunoconteúdo de TH e IL-1 $\beta$  na medula espinhal de roedores;
- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre imunoconteúdo de TH receptor D1 e IL-1 $\beta$  em DRG de roedores;
- Avaliar os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a infiltração de diferentes células imunes nos DRG de roedores;
- Avaliar os efeitos da inibição da síntese de BH4 sobre as alterações nociceptivas induzidas pela administração i.n. do MPTP em roedores.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

#### 4.1.1. Ratos wistar

Foram utilizados ratos Wistar (12-16 semanas, 250-320 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ratos ficaram alojados em grupos de quatro a cinco animais por gaiola plástica (50 × 30 × 15 cm), em ambiente com temperatura controlada em  $22 \pm 2$  °C, ciclo claro-escuro de 12 h e livre acesso à água e ração. Os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram previamente aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob protocolo número 1454/2017.

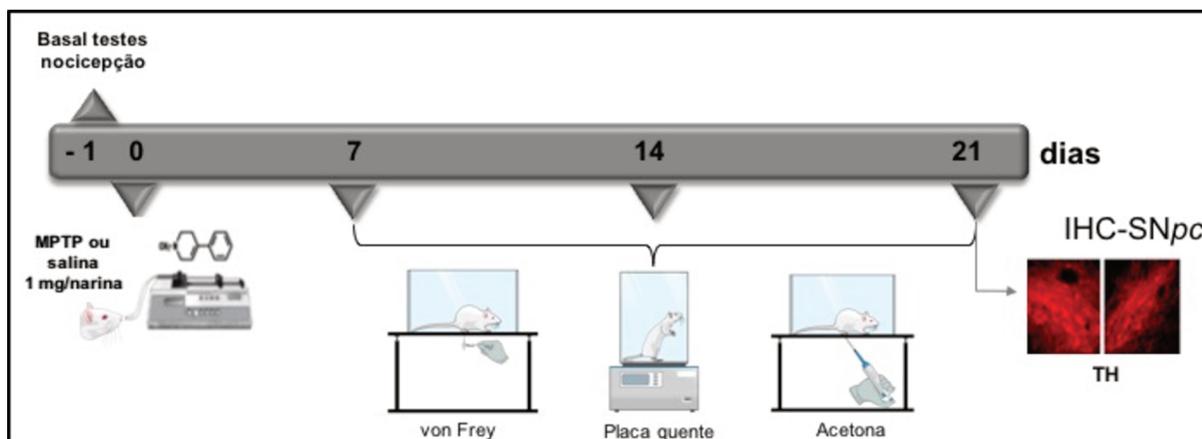
#### 4.1.2. Camundongos C57BL/6J

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6J (10-14 semanas, 20-25 g) provenientes do *The Jackson laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). Os animais foram alojados entre grupos de 3 a 4 animais por caixa (29 x 22 x 14 cm), em salas com temperatura controlada entre  $22 \pm 1$ °C com livre acesso a comida e água, ciclo claro-escuro 12/12h (luzes acendiam às 6h). O projeto foi aprovado pelo comitê de ética da Université de Montréal, sob protocolo de número 19027/2019.

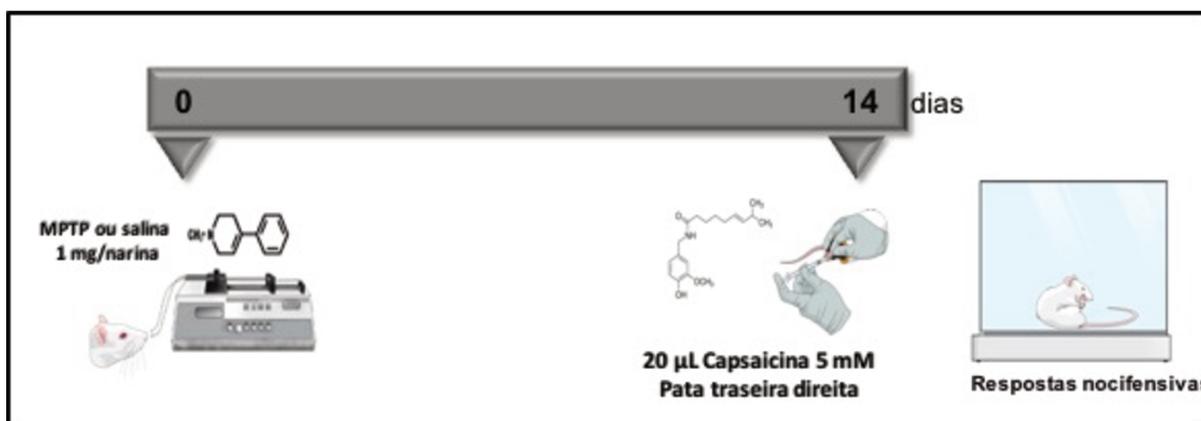
### 4.2 Experimentos *in vivo*

#### 4.2.1 Protocolos experimentais

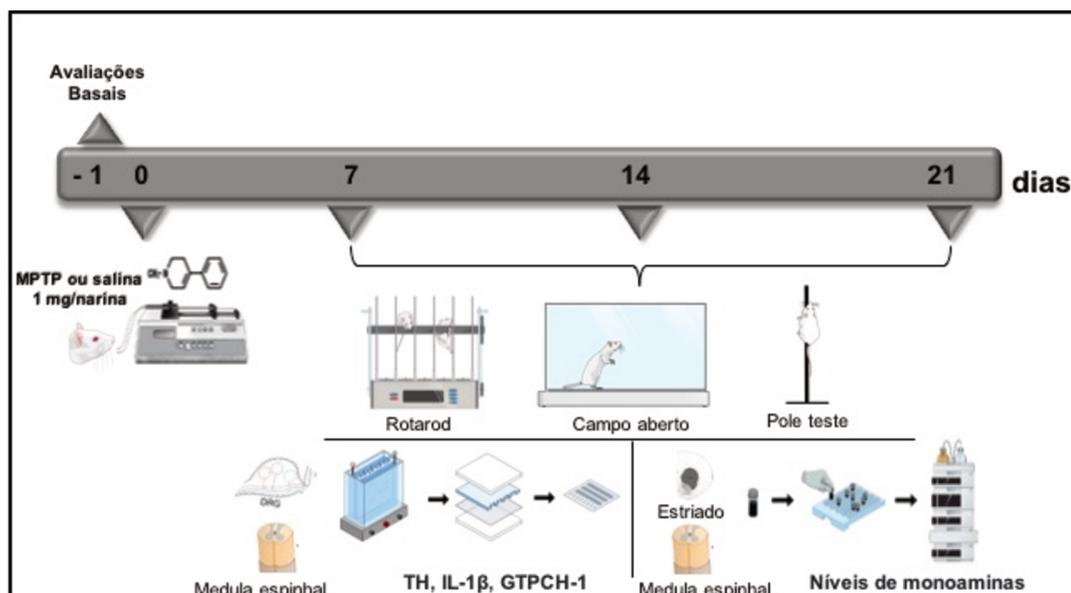
### Protocolos experimentais desenvolvidos em ratos Wistar



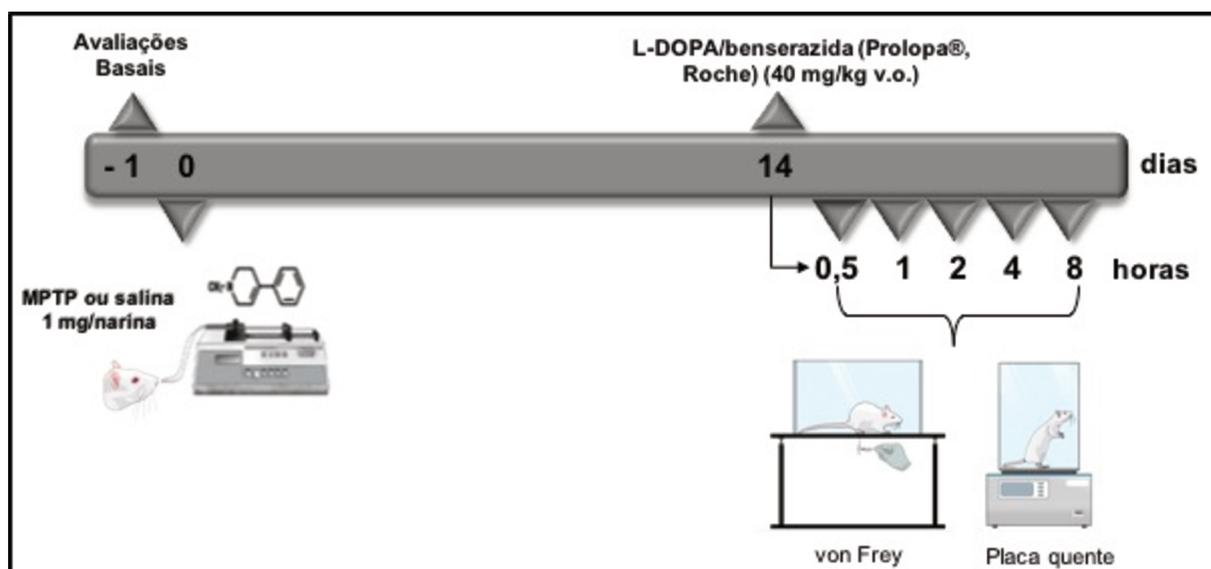
**Protocolo 1:** Inicialmente, foi determinado os valores basais dos ratos nos testes de von Frey, placa quente e acetona. Após as avaliações basais, os animais foram randomicamente alocados em dois diferentes grupos, Controle e MPTP. Um dia depois, os ratos foram administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (1 mg/narina), e avaliados nos testes de von Frey, placa quente e acetona nos dias 7, 14 e 21 após a administração. Posteriormente ao último dia de avaliação comportamental, os animais foram anestesiados, perfundidos com salina e paraformaldeído 4% e os encéfalos removidos para realização da técnica de imunofluorescência para TH na SNpc.



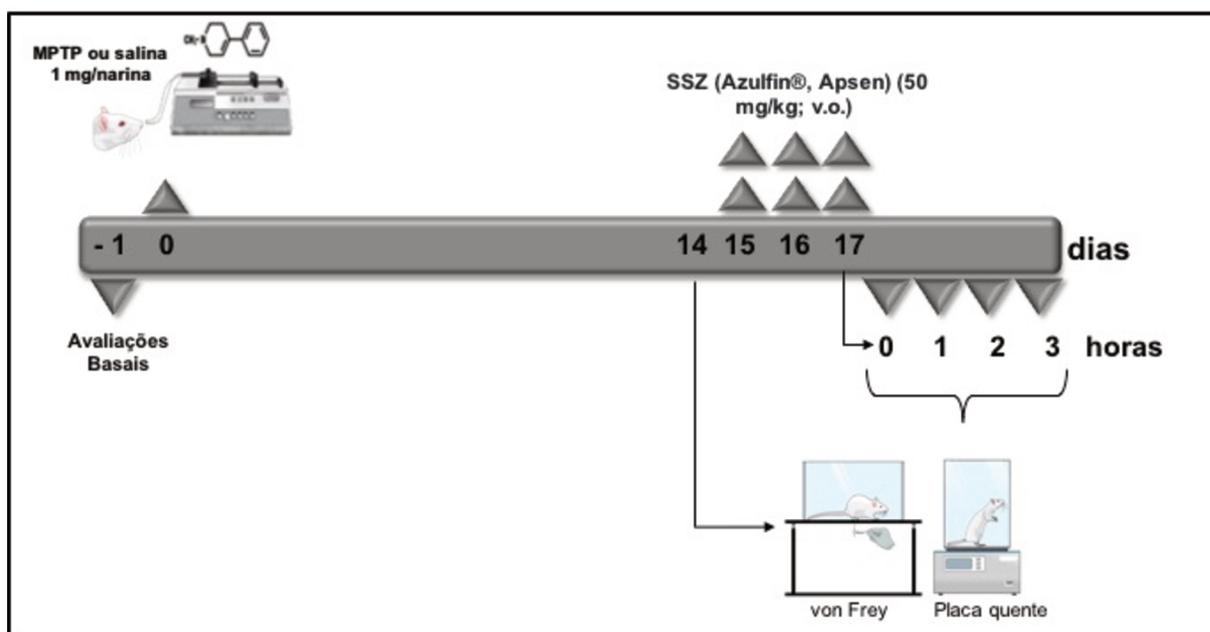
**Protocolo 2:** Ratos Wistar foram administrados com MPTP (1 mg/narina) ou salina pela via i.n., e 14 dias após receberam 20 µL capsaicina 5 mM ou veículo na pata traseira direita. As respostas nociceptivas de lambe, morder e/ou sacudir a pata foram avaliadas durante 5 minutos.



**Protocolo 3:** Primeiramente, foi determinado os valores basais de latência de queda no teste do rotarod. Em seguida, os animais foram randomicamente alocados em 6 grupos: Controle (dia 7, 14 e 21) e MPTP (dia 7, 14 e 21), administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (1 mg/narina), e avaliados nos testes de campo aberto, *rotarod* e *pole* teste. Logo após as análises comportamentais, os animais foram eutanasiados para remoção do estriado, medula espinal e gânglios da raiz dorsal. Metade das amostras foram utilizadas para análise dos níveis monoaminas pela técnica de HPLC, e outra metade foi utilizada para análises de imunoconteúdo de TH, IL-1 $\beta$ , GTPCH1 utilizando a técnica de *western blott*.

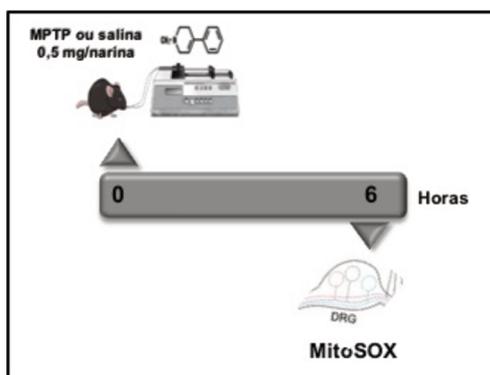


**Protocolo 4:** Após as avaliações basais dos testes de von Frey e placa quente, os animais foram randomicamente alocados em quatro diferentes grupos: Controle, MPTP, L-DOPA e MPTP+L-DOPA. Um dia após, os ratos foram administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (1 mg/narina), e 14 dias depois foram tratados com L-DOPA/benserazida (Prolopa®, Roche) (40 mg/kg v.o.), e foram avaliados nos testes de von Frey e placa quente 0,5, 1, 2, 4 e 8 horas após a administração de L-DOPA.

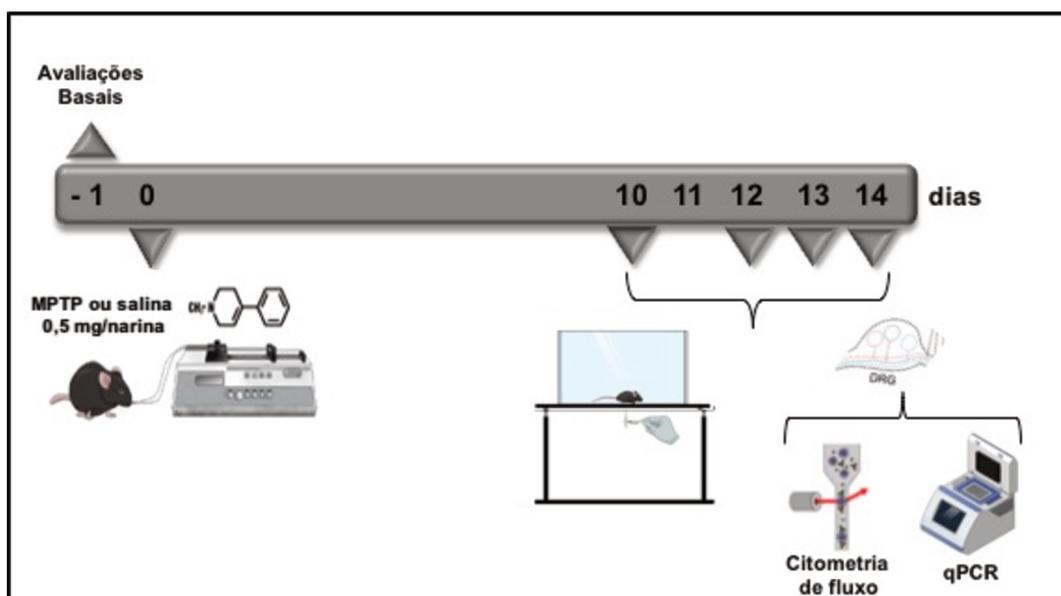


**Protocolo 5:** Após as avaliações basais dos testes de von Frey e placa quente, os animais foram randomicamente alocados em quatro diferentes grupos: Controle, MPTP, sulfassalazina (SSZ), MPTP+SSZ. Um dia após, os ratos foram administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (1 mg/narina), no 14 dia foram avaliados nos testes de von Frey e placa quente, e em seguida passaram a receber SSZ (Azulfina®, Apsen) (50 mg/kg; v.o.) (LATREMOLIERE et al., 2015) duas vezes ao dia durante 3 dias, e foram avaliados nos mesmos testes comportamentais imediatamente e até 3 horas após a última administração de SSZ.

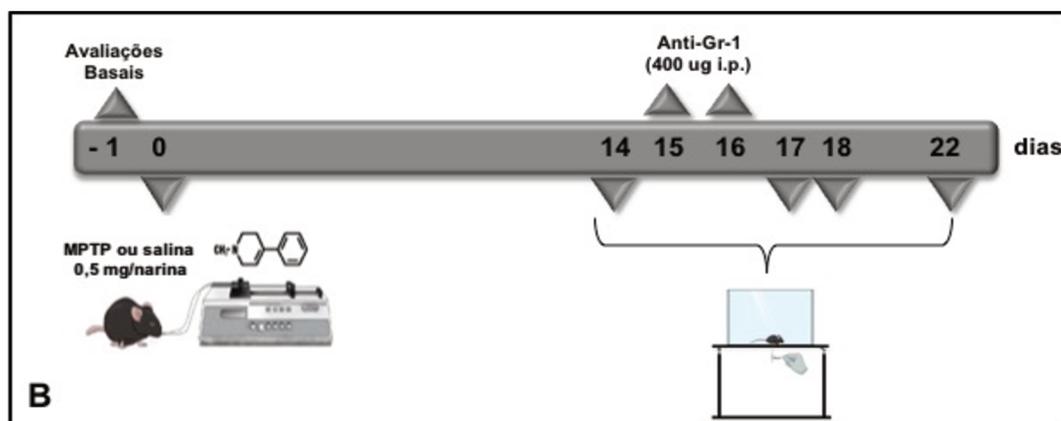
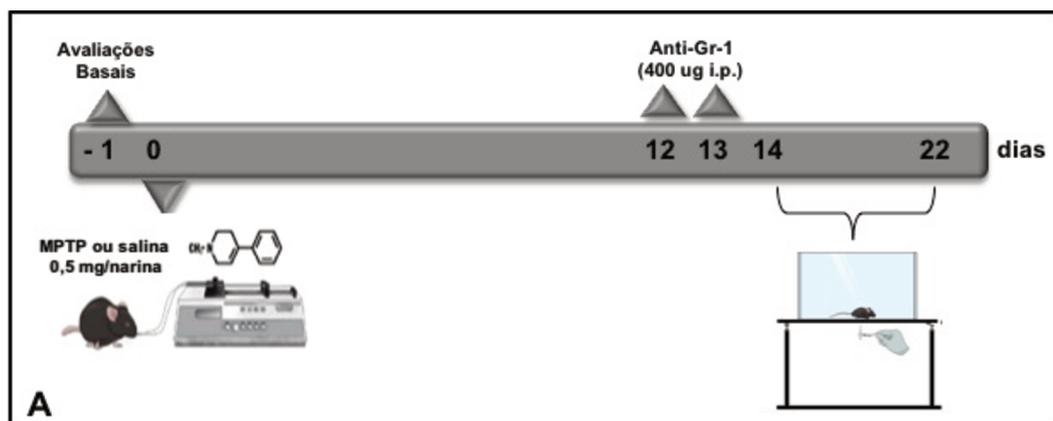
### Protocolos desenvolvidos em camundongos C57BL/6J



**Protocolo 6:** Os camundongos foram administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (0.5 mg/narina), e eutanasiados após 6 horas. Os DRGs foram removidos, fatiados e incubados com a sonda mitoSOX por 30 min, para quantificar os níveis de ânion superóxido.



**Protocolo 7:** Inicialmente, foram determinados os valores basais dos camundongos no teste do von Frey. Em seguida, os animais foram randomicamente alocados em 8 grupos: Controle e MPTP (dias 10, 12, 13 e 14). Um dia após, os animais foram administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (0.5 mg/narina). Nos dias determinados, os animais foram avaliados no teste de von Frey e eutanasiados logo após as análises comportamentais para remoção dos DRGs. Os DRGs foram dissecados e metade da amostra foi utilizada para a técnica de citometria de fluxo, e a outra metade para extração de RNA, para a realização da técnica de PCR quantitativo.



**Protocolo 8:** Após as avaliações basais, os camundongos foram administrados com MPTP ou salina pela via i.n. (0.5 mg/narina) no dia 0 e tratados com InVivoPlus anti-mouse Ly6G/Ly6C (Gr-1) (BioXcell # BP0075) (400 ug/200 ul; i.p.) (CHIU et al., 2013), em dois diferentes protocolos. No primeiro protocolo (A), os animais foram tratados com o anti-Gr-1 nos dias 12 e 13 e avaliados no teste do von Frey dos dias 14 a 22 após o MPTP. No segundo protocolo (B), os animais receberam o mesmo anti-Gr-1, nos dias 15 e 16 e foram avaliados no von Frey nos dias 14, 17 a 22 após o MPTP (B).

#### 4.2.2 Administração intranasal de MPTP

O MPTP (cloridrato) foi obtido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) (protocolos com camundongos) ou da Cayman Chemical (Ann Arbor, USA) (protocolos em ratos) e dissolvido em solução salina (Cloreto de sódio 0,9%) na concentração de 10 mg/mL. A dose utilizada em ratos (1 mg/narina) foi baseada em estudos prévios (PREDIGER et al., 2011; CASTRO et al., 2013), enquanto a dose para camundongos (0.5 mg/narina) foi padronizada em um experimento piloto (dados não mostrados). O procedimento para administração i.n. foi realizado de acordo com Prediger e colaboradores (PREDIGER et al., 2010). Inicialmente os animais foram levemente anestesiados com isoflurano 0,96% (0,75 CAM, Abbot Laboratórios do Brasil Ltda., RJ, Brasil) usando um sistema vaporizador (SurgiVet In., WI, USA). Em

seguida, os animais foram administrados utilizando o sistema para a administração i.n., o qual é composto por um tubo de polietileno (PE-50 e PE-10, para ratos e camundongos, respectivamente), conectado a uma micro-seringa de 50  $\mu$ L ou 10  $\mu$ L (Hamilton, USA), acoplada à uma bomba de infusão (taxa de infusão 10  $\mu$ L/min). Os animais receberam a primeira administração (10  $\mu$ L/narina para rato, 5  $\mu$ L/narina para camundongos) na narina direita e após um intervalo de 10 minutos para recuperação da função respiratória, o procedimento foi repetido na narina esquerda. Todas as manipulações com o MPTP seguiram as normas de cuidado e seguranças previamente preconizadas (PRZEDBORSKI et al., 2001).

#### 4.2.3 Avaliações comportamentais

Os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais para avaliar as alterações nociceptivas e motoras. Todos os testes foram conduzidos durante o ciclo claro, em uma sala com isolamento acústico, na qual os animais foram previamente habituados por pelo menos 1 h. Afim de evitar resíduo de odores, os aparatos foram limpos com uma solução de etanol 10% e foram secos com papel toalha após a retirada de cada animal.

##### 4.2.3.1. Teste do von Frey

Com o objetivo de avaliar a sensibilidade mecânica, foi mensurado o limiar de retirada da pata após a aplicação dos filamentos de von Frey, usando o paradigma “Up-and-Down”, conforme procedimento descrito primeiramente por Chaplan e colaboradores (1994) (CHAPLAN et al., 1994). Para realização desse teste, os animais foram alocados individualmente em câmaras acrílicas sobre uma plataforma elevada com assoalho em grade, o qual permite acesso às patas. Após período de ambientação de 20 minutos a uma hora, os filamentos de von Frey (6 - 100 g para ratos; 0,008 - 2 g para camundongos) foram aplicados individualmente na superfície plantar da pata traseira direita dos animais, com incrementos logarítmicos crescentes de força. Na ausência de retirada da pata, a resposta foi considerada negativa, e o próximo filamento, mais calibroso, foi então utilizado. No caso de resposta positiva, reconhecida pelo levantar, chacoalhar ou lambeir da pata, o filamento imediatamente menos calibroso foi aplicado. Em casos de ambulação ou de movimentos não relacionados à resposta nociceptiva no momento da aplicação do filamento, a resposta foi considerada ambígua, e foi realizada nova estimulação. Foram realizadas 6 medidas, com um intervalo de aproximadamente 30 segundos entre cada uma. No caso de 4 respostas positivas ou negativas desde a primeira aplicação, o teste era finalizado. Um dia antes do tratamento com MPTP, a resposta de todos os animais foi

mensurada para se estabelecer o valor basal de resposta a este estímulo. O conjunto de 4 ou 6 respostas obtido foi utilizado para o cálculo do limiar 50% de resposta (DIXON, 1965), como mostrado a seguir:  $\text{Limiar } 50\% (g) = 10 [X_f + k\delta]$  onde  $X_f$  = valor do último filamento de von Frey usado (em log);  $k$  = valor tabelado para o padrão de respostas positivas/negativas obtidas (DIXON, 1965);  $\delta$  = diferença média (em log) entre os estímulos (0,4695). Uma redução significativa do limiar 50% de resposta dos animais foi considerada hipersensibilidade mecânica.

#### 4.2.3.2. Teste da placa quente

A avaliação da sensibilidade ao calor foi avaliada através do teste da placa quente. O teste da placa quente consiste em expor o animal sobre uma chapa metálica aquecida ( $52 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ), até reagir ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambear as patas, com tempo máximo de permanência (cut-off) de 25 segundos (TITA et al., 2001). Um dia antes do tratamento com MPTP, a resposta de todos os animais foi mensurada para se estabelecer o valor basal de resposta a este estímulo. A latência de resposta de cada animal foi registrada, e os resultados foram expressos como porcentagem em relação a latência observada no basal.

#### 4.2.3.3. Teste da acetona

A sensibilidade ao frio foi mensurada usando o método da gota de acetona. Os animais foram ambientados no mesmo aparato utilizado para o teste de von Frey. Na sequência, 50  $\mu\text{L}$  de acetona foram colocados na superfície da pele da pata direita traseira dos animais. Após a aplicação da acetona, foi mensurado o tempo (s) em que o animal permaneceu exibindo os comportamentos de elevação, agitação e lambida da pata injetada durante o período de 1 minuto. O teste foi realizado em triplicata, com intervalo de 5 minutos entre cada repetição. Assim como para os outros testes, a resposta basal de todos os animais foi mensurada antes do tratamento com MPTP. Os resultados foram expressos em tempo (segundos).

#### 4.2.3.4. Teste da capsaicina intraplantar

Primeiramente, os animais foram ambientados durante 5 minutos na caixa espelhada (dimensões). Em seguida, capsaicina (20  $\mu$ L, 5 mM) foi injetada na pata traseira direita, utilizando uma microseringa com agulha de 26-gauze. A resposta dos animais durante 5 minutos após a injeção foi gravada e posteriormente avaliada por um experimentador treinado. Foi quantificado o tempo em que o animal exibiu os comportamentos de elevação, agitação e lambida da pata injetada e os resultados foram expressos como tempo total (segundos) de respostas nociceptivas.

#### 4.2.3.5. Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para determinar a atividade locomotora espontânea dos animais (BASSO; BEATTIE; BRESNAHAN, 1995). Durante os experimentos, cada rato foi colocado no centro do campo aberto e as sessões experimentais gravadas por um sistema de vídeo durante o período de 10 minutos. A distância percorrida (m) foi avaliada através do software ANY-maze® e considerada como um índice de atividade motora.

#### 4.2.3.6. Rotarod

A coordenação motora e o equilíbrio dos animais foram avaliados utilizando o aparato do rotarod (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), o qual consiste de uma caixa de acrílico dividida em quatro compartimentos com uma barra rotacional entre eles, que pode girar com velocidade constante, ou com aceleração regulável de 1 rpm/s. Primeiramente, foi realizado uma avaliação basal na qual o animal é testado em 3 tentativas de 1 minuto com velocidade constante de 5 rpm. Os animais que permaneceram no rotarod por 1 minuto foram incluídos no estudo e submetidos ao tratamento com MPTP ou salina. No dia dos testes, os animais foram colocados sobre o cilindro sob uma rotação (5 rpm). Após o período de habituação, iniciou-se o período de teste no qual a rotação do cilindro acelerava progressivamente até o máximo de 40 rpm. A latência para queda foi aferida como indicativo da função motora em um tempo máximo de 5 min de teste (THOMAS TAYRA et al., 2013).

#### 4.2.3.7. Teste da descida em viga vertical (“*Pole*” test)

O *pole* teste foi utilizado para avaliar prejuízos motores, em especial a bradicinesia, ou lentidão de movimentos (MATSUURA et al., 1997). Para este teste, o animal foi colocado logo abaixo do topo de um poste de madeira vertical (50 centímetros de altura e 1 centímetro de diâmetro) com a cabeça virada para o topo do poste, e foi mensurado o tempo de latência para o animal virar completamente de posição. O teste foi realizado em triplicata, com intervalos de 60 segundos entre cada repetição, e o tempo máximo atribuído para execução da tarefa foi de 120 segundos. O resultado foi expresso como a média entre as 3 repetições.

### 4.3 Análises *ex vivo*

Para a realização dos ensaios *ex vivo*, os animais foram anestesiados com isoflurano e eutanasiados por decapitação, em diferentes tempos, conforme descrito nos protocolos experimentais. Conforme o protocolo em questão, foi coletado estriado, medula espinhal e/ou DRGs, os quais foram utilizados para diferentes análises moleculares (descritas detalhadamente em seguida). Para as análises por Western blotting, e HPLC, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a em freezer - 80°C até o momento das análises. Para a avaliação dos níveis de ânion superóxido em fatias de DRG, o tecido foi processado e a análise foi realizada imediatamente após a coleta do mesmo. Para a imunistoquímica para TH na SNpc, os animais foram anestesiados com isoflurano perfundidos com salina (NaCl 0.9%) seguido de solução de paraformaldeído 4%, e ao final foi coletado o encéfalo, o qual foi preparado e fatiado para a realização da imunomarcagem.

#### 4.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica

As amostras de estriado e medula espinhal obtidas no **Protocolo experimental 3**, foram utilizadas para determinação dos níveis teciduais de dopamina (DA), seu metabólito 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC), noradrenalina (NE) e 5-hidroxitriptamina (5-HT), utilizando um sistema modular de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – do inglês: High Performance Liquid Chromatography; Water, Milford, EUA; modelo Alliance e2695). O sistema utilizado era composto por uma bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático refrigerado e um aquecedor de coluna que fica acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Water 2465

(Milford, EUA). Um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro (operado em corrente contínua de +700 mV), um eletrodo de referência de Ag/AgCl *in situ* (ISAAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável compõem a célula analítica de fluxo. A preparação das amostras para a extração dos analitos foi realizada através da homogeneização dos tecidos em solução de ácido perclórico 0,1M contendo 0,02 % de metabissulfito de sódio, além de uma concentração conhecida de DHBA (padrão interno). Em seguida, as amostras foram colocadas em banho de ultrassom de 40 kHz durante 20 min e posteriormente centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min a 4°C. Então, o sobrenadante foi recolhido em microtubos pelo autoinjeter (4°C) e uma alíquota (20 µL) de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 10 min. O carregamento das amostras pelo sistema foi feito através de fase móvel composta de 60 mM de fosfato de sódio dibásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,2 mM de 1-octanossulfonato de sódio, 0,5 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 2 mM de cloreto de sódio, 50 µM de EDTA dissódico, 10% de acetonitrila e água ultrapura, pH = 4,2, filtrada em membrana de acetato de celulose (0,45 µM, Millipore) e degaseificada a vácuo durante 10 min em banho de ultrassom de 40 kHz.

Um fluxo gradiente foi utilizado (0 – 6 min = 0,20 mL/min; 6 – 10 min = 0,35 mL/min) através de uma pré-coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, EUA) e coluna de fase reversa (C18) modelo Synergi Hydro-RP, 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com 19 partículas de 4 µM de diâmetro (Phenomenex, Torrance, EUA), ambas a temperatura de 30°C. Para controle, aquisição e processamento dos dados foi utilizado o programa Empower 2 ® (Waters Co.). Os dados foram mensurados de acordo com as curvas de calibração de cada analito (10 – 1000 ng/mL) e expressos em ng de analito por mg de tecido úmido.

#### 4.3.2. Determinação de conteúdo proteico por imunodeteção por western blott

As amostras de DRG e medula espinhal obtidas no **Protocolo experimental 3** foram homogeneizadas em um tampão 50 mM de Tris, contendo 1 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% de triton X-100, 10% de glicerol 100% e coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, EUA). Para eliminação de resíduos, as amostras foram centrifugadas (3000 rpm por 10 min a 4°C). A determinação de proteínas totais foi realizada através do método de Lowry *et al.* (1951).

Para a eletroforese, 50 µg de proteína total em tampão composto por ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (1mM), 100 mM de fluoreto de sódio (NaF), 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) e 2 mM de ortovanadato de sódio foram separados em gel de eletroforese composto por 12% de poli(acrilamida)-dodecil sulfato de sódio (SDS). Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno, que foi bloqueada com uma solução de leite em pó desnatado a 5 %. Após as devidas lavagens com tampão Tris 10 mM, 0,075% de

Tween-20 (TBST), as membranas foram incubadas a 4°C durante a noite com os seguintes anticorpos primários: anti-TH (1:1000, #ab112, Abcam), ou anti-D1R (1:500, #sc1434, Santa Cruz), ou anti-IL-1 $\beta$  (1:1000, #sc7884, Santa Cruz). Na sequência, as membranas foram incubadas com os seus respectivos anticorpos secundários conjugados à peroxidase (Upstate Cell Signaling, SP, Brasil) por 1 h a temperatura ambiente. Para controle de carregamento, utilizou-se a detecção da proteína  $\beta$ -actina, através da incubação das membranas com anticorpo primário anti- $\beta$ -actina conjugado à peroxidase (1:30000, #A3854, Sigma). A revelação foi realizada em aparelho fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, La Jolla, EUA) com solução quimioluminescente (Merck). A densidade óptica relativa (D.O.) das bandas detectadas foi obtida através do programa computacional ImageJ (NIH, Bethesda, EUA). Os valores apresentados estão expressos como % do controle, derivados da divisão da D.O. da banda da proteína de interesse pela respectiva D.O. da banda de  $\beta$ -actina.

#### 4.3.4. Quantificação de tirosina hidroxilase por imunistoquímica

Ao final do **Protocolo experimental 1**, os animais foram anestesiados com isoflurano e perfundidos com salina seguido de solução de paraformaldeído 4%. Após a perfusão os encéfalos permaneceram em paraformaldeído durante 1 dia, posteriormente em sacarose 30% durante 3 dias, e em seguida congelados utilizando isopentano e gelo seco a -60°C. As amostras congeladas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em freezer -80°C para subsequente processamento em criostato no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II, UFSC. Os encéfalos congelados foram cortados em criostato (Leica®) e as fatias de contendo a SNpc (25  $\mu$ m de espessura) foram acondicionadas em microtubos de plástico. As fatias foram lavadas 3 vezes (5 min cada) em PBS 0,1 M + 0.15 % Triton-X (pH 7.4; tampão de lavagem) e então pré-incubadas por 30 min com solução de peróxido de hidrogênio 1% em PBS para parar a atividade da peroxidase endógena. Para evitar reações inespecíficas, as fatias também foram incubadas em uma solução de BSA (do inglês bovine serum albumin) 5% em tampão de lavagem e 5% de soro de galinha durante uma hora. As fatias foram incubadas com o anticorpo primário (anti-TH, 1:1500, ab-112 Abcam) por 16 h a uma temperatura de 21 °C sob agitação. Em seguida, as fatias foram lavadas com o tampão de lavagem por 3 vezes durante 5 min cada e incubadas com o anticorpo secundário por 2 h (anticorpo de cabra anti-coelho, 1:2000; ab60317, Chromeo™ 546 Abcam). As fatias foram novamente lavadas com o tampão de lavagem por 3 vezes de 5 min, e então, transferidas para as lâminas e cobertas com lamínulas. As imagens foram obtidas em microscópio fluorescente invertido (IX83, Olympus, Japão), no Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia II, UFSC. Para a quantificação das imagens foi utilizado o software Image J® obtido no endereço eletrônico <http://imagej.nih.gov/ij/>. Foi realizada a contagem

dos corpos celulares marcados em fatias representativas de diversos níveis ao longo do eixo rostro-caudal.

#### 4.3.5. Determinação de superóxido mitocondrial em fatias de DRG

Para a determinação de ânion superóxido mitocondrial em fatias de DRG, foi utilizada a sonda fluorescente mitoSOX<sup>TM</sup> Red (Life Technologies, M36008). Conforme o **Protocolo experimental 6**, 6h horas após a administração i.n. de MPTP, os DRGs foram removidos, mantidos em DMEM (do inglês: Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a 37°C, posteriormente fatiados e colocados em lamínulas de vidro previamente revestidas com poli-L-lisina 0.1 %, e incubados com a sonda mitoSOX por 30 min a 37°C. A sonda penetra nas células vivas, onde atinge seletivamente as mitocôndrias. Na presença de superóxido, a sonda é oxidada gerando um produto fluorescente. Imagens foram obtidas em microscópio fluorescente invertido (Nikon Ti2, Japão). Para a quantificação das imagens, foi mensurado a intensidade de fluorescência vermelha, utilizando o software Image J®.

#### 4.3.6. PCR quantitativo

Os DRGs dos animais do **Protocolo experimental 7** foram extraídos e mantidos em meio de cultivo celular (DMEM) contendo 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado por calor, e em seguida foram centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o DMEM foi removido e as amostras de DRG foram submetidas a digestão em uma solução de colagenase/dispase durante 80 minutos a 37°C. Então, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com DMEM e ressuspendidas em DMEM contendo 2,5 % de DNAase. Para a etapa de trituração, foram utilizadas pipetas de vidro polidas a fogo com diâmetros diminuídos. Para remoção de debris celulares, um gradiente de BSA foi utilizado (PBS 1X sobre 10% de BSA). Após 12 minutos de centrifugação a 1000 rpm, os debris celulares foram cuidadosamente removidos e o precipitado foi lavado com DMEM. Baseado nessa solução de células individuais, o RNA foi extraído usando kit manufaturado específico de acordo com as recomendações do fabricante (E.Z.N.A. Total RNA Kit, R-6834-02, OMEGA bio-tek). A concentração e a pureza de RNA foram determinadas usando BioDrop  $\mu$ LITE+ (BioDrop) e protocolo com transcriptase reversa foi realizado para obter o cDNA. Em resumo, SuperScript VILO (1924228, Invitrogen) foi incubado com RNA usando um termociclador (micPCR, MBI Lab Equipment) configurado a: 10 min a 25°C, 60 min a 42°C, 5 min a 85°C. A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada usando Mix Fast SYBR Green Master (00613414, applied biosystems) com 5 ng de cDNA em água tratada

DEPC, filtrada e esterilizada a vapor (18DC0201, growcells). As sequências dos primers utilizados foram: Tirosina Hidroxilase (TH): Primer 1 (FOR.) 5'-GAGAGGACAAGGTTCCCTGG -3'; Primer 2 (REV.) 5'-CTTCAGCGTGGCGTATACCT -3'; Receptor tipo 1 de interleucina 1 (IL1R1): Primer 1 (FOR.) 5'-GGGGGAAGCAATATCCGGTC -3'; Primer 2 (REV.) 5'-CATTGATCCTGGGTCAGCTTC -3'. O ensaio de qPCR foi realizado em triplicata usando um termociclador configurado a: 20 segundos a 95°C, 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C (40 ciclos), 60°C para 0,3°C / segundos. Os resultados foram analisados pelos valores de limiar de ciclo (Ct, do inglês Cycle Threshold) através de software micPCR v2.8.1 e o nível de expressão da TH foi determinada por método utilizando  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  camundongo controle – e  $\Delta Ct$  camundongo MPTP. Para determinar os níveis de expressão, foi usado um gene controle de  $\beta$ -actina (Primer 1 (FOR.) 5'-TGTCGAGTCGCGTCCACC-3'; Primer 2 (REV.) 5'-TATCGTCATCCATGGCGAACTGG-3', 84501267, invitrogen).

#### 4.3.7. Análises por citometria de fluxo

Os DRGs dos animais do **Protocolo experimental 7** foram extraídos e mantidos em meio de cultivo celular DMEM contendo 1% de penicilina/ estreptomicina e 10% de soro fetal bovino inativado por calor, e em seguida foram centrifugados a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, o DMEM foi removido e as amostras de DRG foram submetidas a digestão em uma solução de colagenase/dispase durante 80 minutos a 37°C. Então, as amostras foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos, lavadas com DMEM e ressuspensas em DMEM contendo 2,5% de DNAase. Para a etapa de trituração foram utilizadas pipetas de vidro polidas a fogo com diâmetros diminuídos. O lisado de células foi então filtrado em um filtro de células (35  $\mu$ M), lavado com PBS, suspenso e incubado por 20 minutos com o marcador de viabilidade celular (Zombi VD) por 15 minutos a 4°C. Em seguida, foi bloqueado em PBS contendo 2% BSA e Fc $\gamma$ RI mAb durante 10 minutos. Na sequência, o seguinte painel de anticorpos foi utilizado para a imunomarcação: (Biolegend) APC rat anti-mouse CD45, PE rat anti-mouse Ly6-G, FITC rat anti-mouse Ly6-C. A citometria de fluxo foi realizada em instrumento FACSCanto II (BD Biosciences) e analisado com o software FlowJo (TreeStar).

## 4.4 Experimentos em culturas de neurônios de gânglios da raiz dorsal

### 4.4.1. Culturas de neurônios do DRG

DRGs de camundongos C57BL/6J (8 semanas) foram dissecados em meio DMEM (Life Technologies, CA, USA) com 50 U/mL penicillina e 50 µg/mL de estreptomicina (Fisher, #MT-3001-CI), 2mM L-Glutamina (Life Technologies, # 25030-081) e 10% HI FBS (Life Technologies, #10082-145). Em seguida, as células foram dissociadas em tampão HEPES salina (Sigma, MO, USA) com 1 mg/mL Collagenase A + 2.4 U/mL dispase II (enzymes, Roche Applied Sciences, IN, USA) e incubadas durante 80 minutos a 37°C. Na sequência, os DRGs foram triturados com pipetas de Pasteur de vidro em tamanhos decrescentes em DMEM com DNase, e então centrifugados em um gradiente de BSA 10% para remoção de debris. Ao final, os neurônios foram resuspenso em meio de cultura Neurobasal (acrescido com 0.05 ng/µL NGF (Life Technologies, #13257-019), 0.002 ng/µL GDNF (Sigma, # G1401), 0.01 mM AraC (Sigma, #C6645), e plaqueados em lamínulas de vidro revestidas com laminina, inseridas em placas para cultura de células com 24 poços. As culturas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C, e utilizados para os experimentos com a neurotoxina MPP<sup>+</sup> após 24 h.

### 4.4.2. Determinação do potencial de membrana mitocondrial

Com o objetivo de avaliar a integridade dos neurônios frente aos diferentes tratamentos, foi mensurado as variações no potencial de membrana mitocondrial (PMM) através da utilização do cátion lipofílico JC-1 (Kit Cayman, # 10009172). Para isso, após 24 h em cultura, os neurônios de DRG foram tratados com veículo ou nomifensina (Sigma, #N1530) (10 µM) por 30 minutos antes da incubação com MPP<sup>+</sup> (Sigma, #D048) (5 µM) e/ou seus respectivos veículos durante 24 h. As concentrações foram definidas em experimentos prévios (dados não mostrados). Após os tratamentos, a sonda JC-1 (solução de coloração diluída 1:10) em meio Neurobasal foi adicionada aos poços, e mantida por 30 minutos em estufa de CO<sub>2</sub>. Em seguida, os poços foram lavados com solução tampão (acompanha o Kit), e em seguida foi capturado imagens em microscópio Nikon Ti2 (excitação/emissão 488–590 nm e excitação/emissão 488–530 nm). A intensidade de fluorescência nas duas cores foi mensurada no software ImageJ®, e a determinação do potencial de membrana mitocondrial foi realizada através do cálculo da relação entre a fluorescência vermelha da sonda (quando o JC-1 encontra-se na forma de agregados; excitação/emissão

488–590 nm) sobre a fluorescência verde (quando o JC- 1 encontra-se na forma de monômeros; excitação/emissão 488–530 nm).

#### 4.5 Perfil de expressão gênica

A fim de demonstrar a expressão do gene de proteínas envolvidas com o metabolismo e toxicidade do MPTP, foram utilizados os dados publicados por USOSKIN e colaboradores (2015). Neste estudo, os autores realizaram sequenciamento de RNA de células únicas de neurônios do DRG da porção lombar (L4-L6) de camundongos fêmeas e machos com 6-8 semanas de idade. No total, 1,14 milhões de leituras foram mapeados para  $3.574 \pm 2.010$  genes / célula). Os resultados foram agrupados de acordo com o tipo celular: TH (tirosina hidroxilase), NF (neurofilamentos); NP (neurônios não-peptidérgicos); PEP (neurônios peptidérgicos), NonN (não-neuronais). Os genes de interesse foram: monoamina oxidase B (maob); transportador de dopamina (DAT); transportador de noradrenalina (NET) e de serotonina (SERT). Os dados foram expressos como média de expressão dos transcritos (razão para actina) em cada um dos tipos celulares.

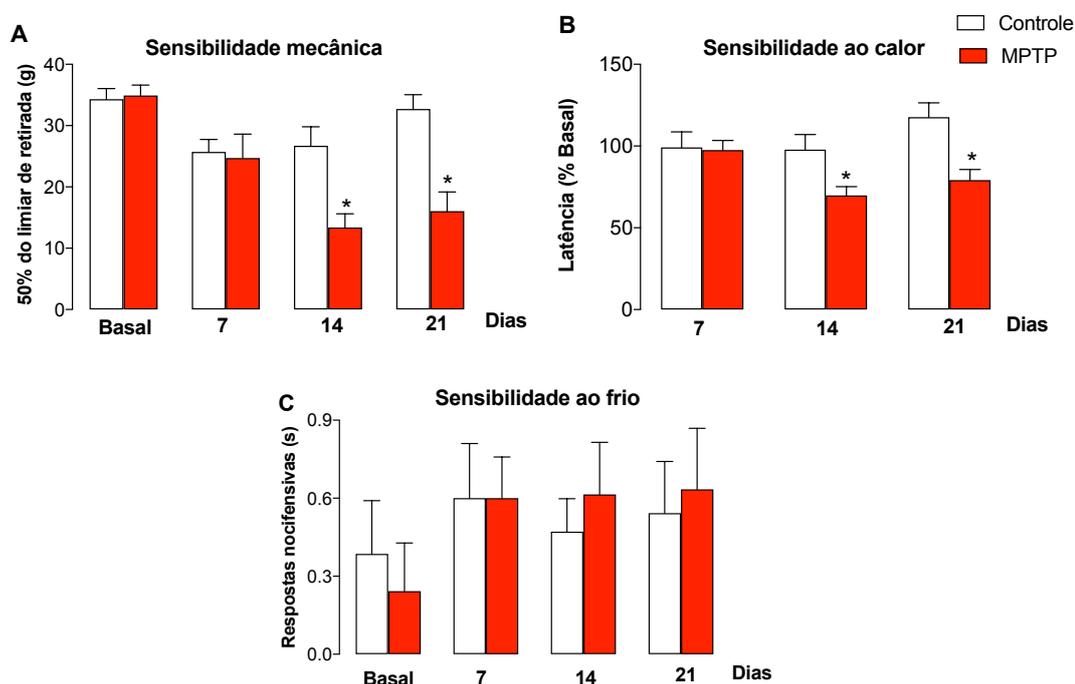
#### 4.6 Análise estatística

A distribuição dos dados foi verificada pelo teste de normalidade de D'Agostino-Pearson. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Para as comparações realizadas entre dois grupos, utilizou-se o teste *t* de Student não pareado. Os resultados estão apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas utilizando os programas computacionais GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, EUA) e Statistica 13.0 (StatSoft Inc., La Jolla, EUA).

## 5 RESULTADOS

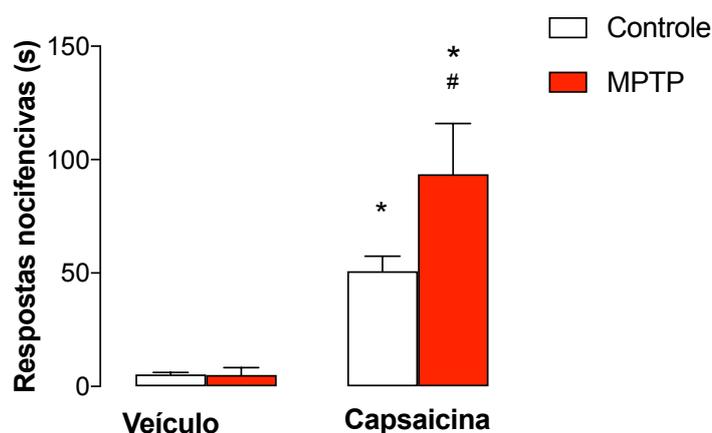
### 5.1 Caracterização das respostas nociceptivas após a administração intranasal de MPTP em roedores

Como primeira etapa deste estudo, foi avaliado se a administração i.n. de MPTP em ratos Wistar e camundongos C57BL/6J induziria alterações nociceptivas frente à diferentes estímulos. Além disso, avaliamos o padrão temporal dessas alterações. A Figura 4 representa os efeitos da administração i.n. de MPTP em ratos Wistar avaliados nos testes de von Frey, placa quente e da acetona, utilizados para avaliar a sensibilidade a estímulos mecânicos, calor e frio, respectivamente. Foi observado que os ratos administrados com MPTP apresentaram um menor limiar de resposta no teste de von Frey (Figura 4A), indicando maior sensibilidade mecânica, além de menor latência de retirada da pata no teste da placa quente, o que indica uma hiperalgesia ao calor (Figura 4B), nos dias 14 e 21 dias após a administração do MPTP. Por outro lado, nenhuma alteração foi observada nas respostas no teste da acetona, indicando ausência de hipersensibilidade ao frio (Figura 4C).



**Figura 4.** Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre as respostas nociceptivas de ratos avaliadas nos testes do von Frey, placa quente e acetona. De acordo com o descrito no [Protocolo experimental 1](#), ratos wistar foram administrados com MPTP ou salina no dia 0 e avaliados nos dias 7, 14 e 21 nos testes do von Frey, placa quente e teste da acetona. (A) 50% do limiar de retirada referentes ao teste do von Frey (B) latência para retirada no teste da placa quente, (C) tempo total de respostas nociceptivas de lamber, morder e/ou sacudir a pata, expresso em segundos (s). Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias com medida repetida, seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls ( $*p < 0.05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia. n = 10 por grupo).

Considerando que as respostas observadas nos testes do von Frey e da placa quente são respostas dependentes de reflexo (KAYSER; CHRISTENSEN, 2000), e que não observamos diferença no teste da acetona, o qual é avaliado por meio de comportamentos que não dependem de reflexo, foram avaliadas as respostas dos ratos frente a capsaicina administrada pela via intraplantar. Para isso, os ratos foram submetidos ao teste da capsaicina intraplantar 14 dias após a administração i.n. do MPTP, sendo este o mesmo intervalo de tempo em que os animais manifestaram a hipersensibilidade nos testes do von Frey e da placa quente. A Figura 5 apresenta os resultados da soma das repostas nociceptivas de lamber, morder e/ou sacudir a pata observadas durante 5 minutos após a administração da capsaicina intraplantar. Foi observado que a administração de capsaicina *per se* induziu aumento das respostas nociceptivas, e o grupo tratado previamente com MPTP apresentou um aumento significativo destas respostas nociceptivas. Isto indica integridade das respostas mediadas por fibras C, e além disso, pode indicar uma sensibilização das fibras mediada pela administração do MPTP.

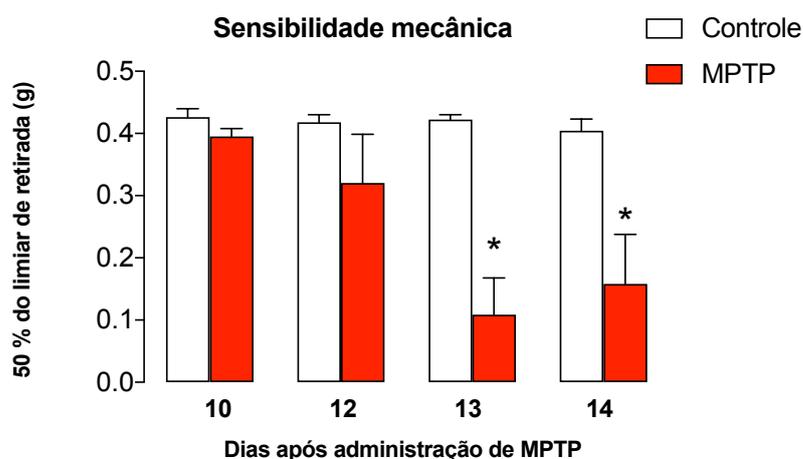


**Figura 5.** Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre a respostas nociceptivas induzidas pela injeção intraplantar de capsaicina (5 mM, 20  $\mu$ L). De acordo com o descrito no Protocolo experimental 2, ratos Wistar foram administrados com MPTP ou salina, e 14 dias depois receberam capsaicina (5 mM) ou veículo na pata traseira direita, e as respostas nociceptivas foram avaliadas durante 5 minutos. (C) Tempo total de respostas nociceptivas de lamber, morder e/ou sacudir a pata, expresso em segundos. A análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias, seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $P < 0.05$  em relação ao grupo salina; #  $P < 0.05$  em relação ao grupo salina+grupo capsaicina. N= 5-6 por grupo).

Na sequência, foi avaliado se a administração i.n. de MPTP promoveria também alterações nas respostas nociceptivas em camundongos. Baseado nos resultados prévios obtidos em ratos, e com o objetivo de avaliar com mais precisão o dia em que os animais começam a apresentar as alterações nociceptivas, as

avaliações comportamentais foram realizadas nos dias 10, 12, 13 e 14 após a administração i.n. de MPTP.

A Figura 6 representa os resultados do teste de von Frey, o qual foi utilizado para avaliar a sensibilidade mecânica em camundongos C57BL/6J. Foi encontrado que a administração i.n. de MPTP é capaz de induzir hipersensibilidade mecânica nessa outra espécie de roedores a partir do 13<sup>o</sup> dia após sua administração. Em outro experimento, também se avaliou a duração dessas alterações, e foi observado que as mesmas persistem por até 49 dias após a administração do MPTP (dados não mostrados).

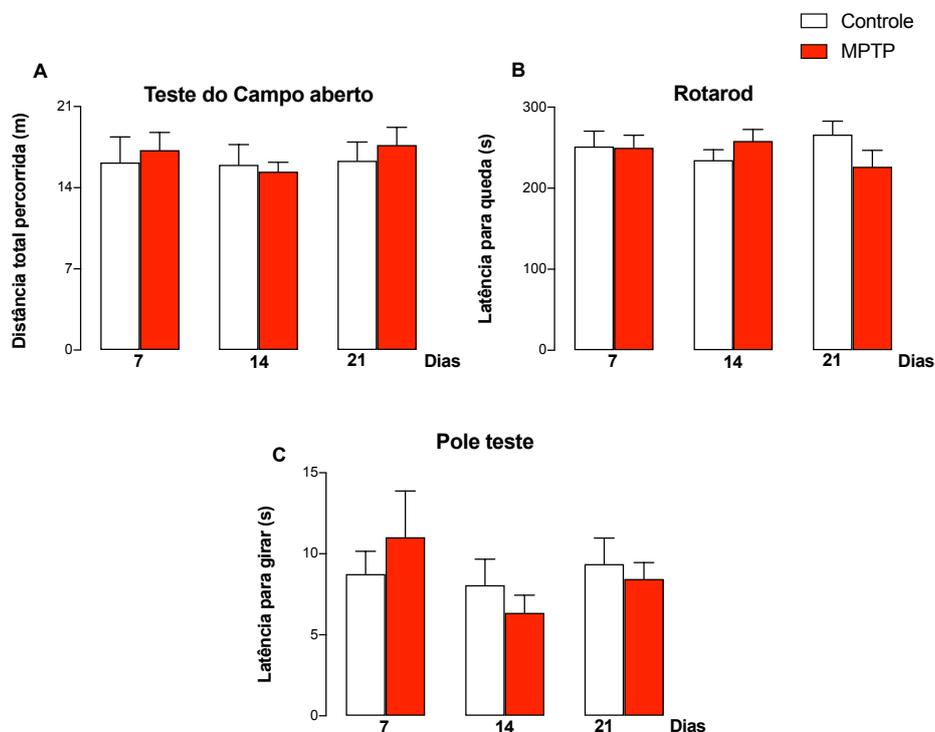


**Figura 6.** Efeito da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre a nocicepção avaliada nos dias 7, 14 e 21. De acordo com o Protocolo experimental 7, camundongos C57BL/6J foram administrados com MPTP ou salina no dia 0 e avaliados nos dias 10, 12, 13, 14, nos testes do von Frey. (A) 50% do limiar de retirada referentes ao teste do von Frey. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias com medida repetida, seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls ( $*p < 0.05$  comparado ao grupo controle no mesmo dia.  $n = 4-7$  por grupo).

## 5.2 Avaliação dos efeitos da administração intranasal de MPTP sobre atividade locomotora e a via dopaminérgica nigro-estriatal

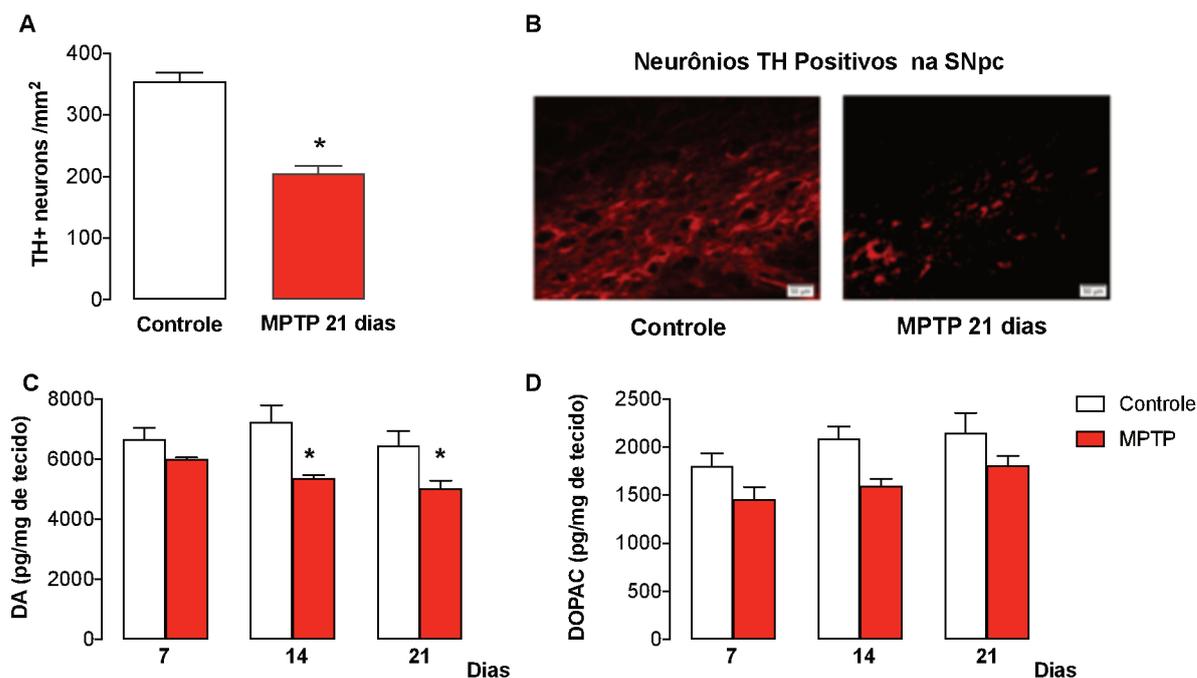
Além dos testes para avaliar a nocicepção, foi também avaliado os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a atividade locomotora dos ratos. Conforme descrito no Protocolo experimental 3, os animais foram testados em diferentes testes comportamentais, a fim de avaliar atividade locomotora (teste do campo aberto), o equilíbrio e a coordenação (teste do rotarod), e também a atividade locomotora mais diretamente associada com a via nigro-estriatal (*pole* teste). A Figura 7A ilustra os resultados obtidos no teste do campo aberto (A) onde foi observado que a administração i.n. de MPTP não alterou de maneira significativa os parâmetros locomotores avaliados no teste do campo aberto. Ainda, o tempo de latência para a

queda no rotarod (Figura 7B) também não foi alterado nesse protocolo, indicando a ausência de prejuízos na coordenação motora e no equilíbrio dos animais. Também não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados do *pole* teste (Figura 7C).



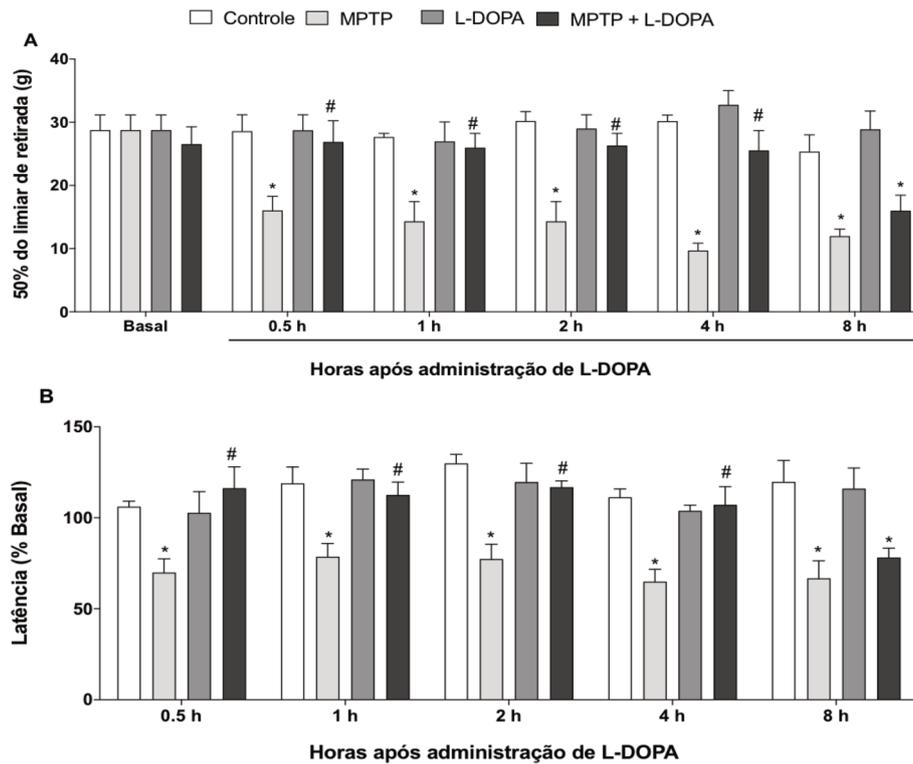
**Figura 7.** Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre diferentes parâmetros de locomoção em ratos. Conforme descrito no Protocolo experimental 3, ratos Wistar foram administrados com MPTP ou salina no dia 0 e avaliados nos dias 7, 14 e 21 nos testes campo aberto, rotarod e pole. (A) Distância total percorrida em metros, durante 5 minutos no campo aberto; (B) latência em segundos para queda no teste do rotarod; (C) tempo de latência para o animal se virar completamente após ser colocado no poste, em segundos. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias com medida repetida (n = 8-10 por grupo).

A fim de avaliar o grau de degeneração na via dopaminérgica nigroestriatal, foi mensurado, por meio de técnicas de imunohistoquímica, o número de células positivas para a enzima TH (usado como marcador de neurônios dopaminérgicos) na SN e os níveis de DA e seu metabólito DOPAC no estriado, com a técnica de HPLC. Observamos que os animais que receberam MPTP tiveram uma diminuição de aproximadamente 40% no número de neurônios TH-positivos na SN no 21º dia após o tratamento (Figura 8A e B), e uma diminuição de cerca de 20% nos níveis de DA no estriado nos dias 14 e 21 após a administração (Figura 8C).



**Figura 8.** Efeito da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre degeneração dopaminérgica na via nigroestriatal em ratos. Experimento 1: Os mesmos ratos que foram submetidos ao protocolo experimental 1, foram eutanasiados no 21º dia após a administração i.n. do MPTP para realização da técnica de imunofluorescência para TH na SNpc. (A) quantificação do número de neurônios TH positivos na SNpc (B) Imagem representativa da imunofluorescência para TH na SNpc. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada pelo teste T de Student. Figura B: Imagens obtidas em microscópio olympus invertido IX83, objetiva de 20x. Escala: 50  $\mu$ m. Experimento 2: Conforme o Protocolo experimental 3, os animais foram administrados com MPTP, avaliados em diferentes testes comportamentais, e eutanasiados nos dias 7, 14 e 21, para remoção do estriado para análise dos níveis de dopamina (DA) e seu metabólito ácido 3,4- dihidroxifenilacético (DOPAC), pela técnica de HPLC. (C) Níveis de DA e (D) níveis de DOPAC, ambos expressos em pg/mg de tecido. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $p < 0,05$  diferente do controle na mesma hora.  $n=4$  por grupo).

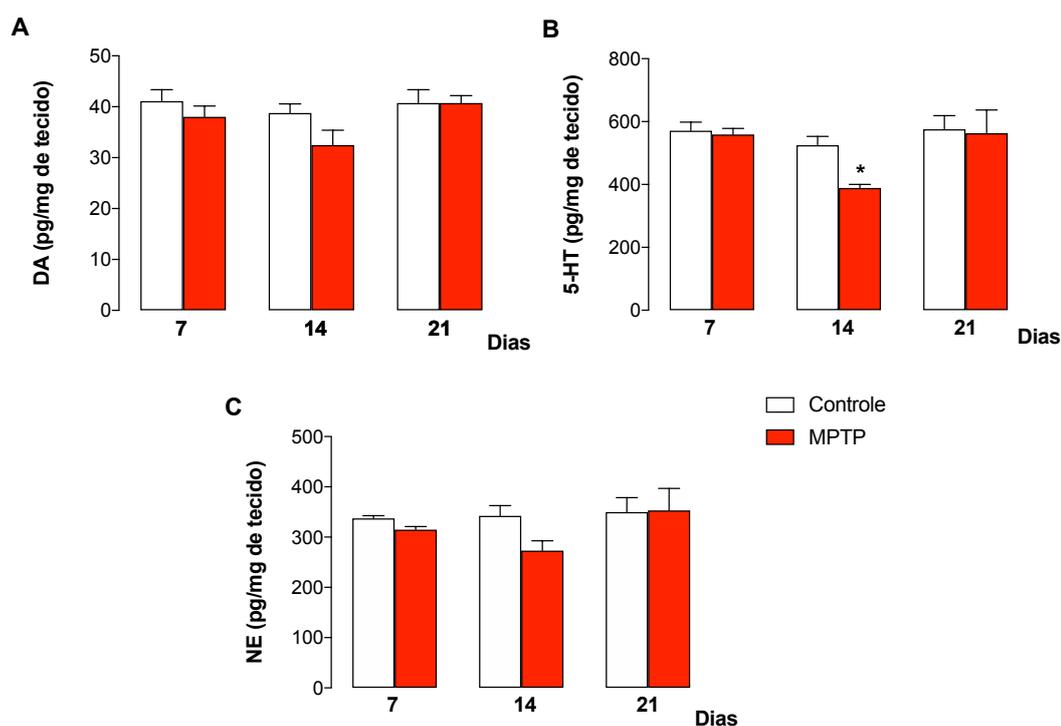
Baseado no papel da DA no controle da nocicepção, foi avaliado o efeito da reposição dopaminérgica sobre as alterações nociceptivas, conforme demonstrado no Protocolo experimental 4. A Figura 9 representa os dados obtidos a partir dos testes comportamentais de von Frey e placa quente. Como resultado, foi obtido que a administração de uma dose única de L-DOPA (40 mg/kg; v.o.) no 14º dia após a administração de MPTP foi capaz de reverter as hipersensibilidades mecânica e térmica. Isso indica o possível envolvimento da DA na fisiopatologia das alterações nociceptivas observadas no nosso modelo.



**Figura 9.** Efeito da administração L-DOPA, um precursor dopaminérgico, sobre a hipersensibilidade ao calor e estímulo mecânico induzido pela administração intranasal de MPTP (1 mg/narina) em ratos. De acordo com o demonstrado no Protocolo experimental 4, ratos wistar foram administrados com MPTP ou salina no dia 0, no 14 dia foram tratados com L-DOPA (40 mg/kg; v.o.) e foram avaliados nos testes de von Frey e placa quente até 8 horas após a última administração de L-DOPA (A) 50% do limiar de retirada no teste do von Frey (B) latência para retirada no teste da placa quente. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls (\*  $P < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo tempo; #  $P < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo MPTP no mesmo tempo,  $n = 8$  por grupo.)

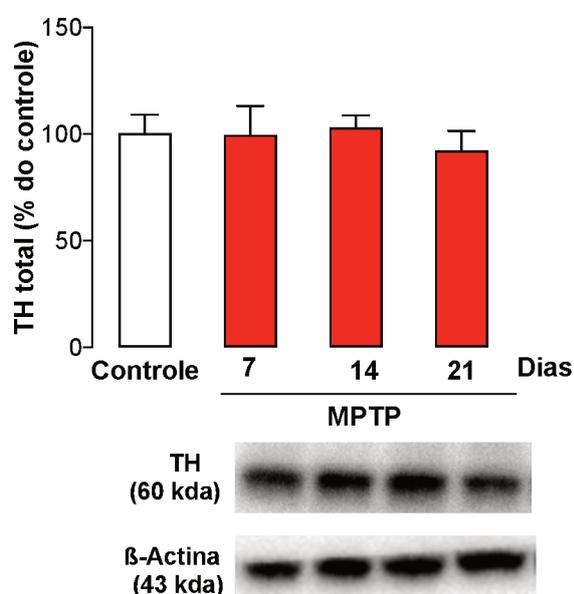
### 5.3 Avaliação dos mecanismos envolvidos com as respostas nociceptivas induzidas pelo MPTP: ênfase alterações na medula espinal

Como mencionado anteriormente, na DP, devido a neurodegeneração progressiva em diferentes áreas do SNC e periferia, o processamento da dor pode ser afetado desde a transmissão de estruturas periféricas aos centros superiores até a sua recepção e interpretação. A nível de medula espinal, é conhecido que as monoaminas DA, 5-HT e NA modulam a nocicepção via regulação da inibição pré-sináptica (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014). Portanto, foi investigado os níveis das mesmas na medula espinal. Os resultados ilustrados na Figura 10 demonstram que a administração i.n. de MPTP em ratos Wistar induz uma diminuição nos níveis de serotonina no dia 14 após sua administração, alteração que foi normalizada no dia 21. Em contrapartida, não foram encontradas diferenças nos níveis de noradrenalina e DA.



**Figura 10.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o conteúdo de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e noradrenalina (NE) na medula espinal. Os ratos foram administrados com MPTP ou salina no dia 0, avaliados em diferentes testes comportamentais, e eutanasiados nos dias 7, 14 e 21, para remoção da porção lombar da medula espinal, para análise dos níveis de dopamina (DA) (A), (B) serotonina (5-HT) e (C) noradrenalina, utilizando a técnica de HPLC. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido do teste post-hoc de *Newman-Keuls* (\* $p < 0,05$  diferente do controle no mesmo dia.  $n=4$  por grupo).

Também foi avaliado o imunoconteúdo de TH na medula espinhal. Os dados representados na Figura 11 mostram não haver diferença no conteúdo proteico da enzima TH, envolvida com a síntese de catecolaminas. Este resultado reforça os resultados anteriores indicando que o MPTP, administrado pela via i.n., não induz alterações dopaminérgicas ou noradrenérgicas na porção lombar da medula espinhal de ratos. Por fim, com o objetivo de avaliar um possível envolvimento de resposta inflamatória na nocicepção observada neste nosso modelo, avaliamos o imunoconteúdo da forma madura da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), citocina liberada por células inflamatórias associada com mecanismos de sensibilização central. Não foi detectado nenhuma quantidade dessa citocina nas amostras de medula espinhal (dados não quantificados).



**Figura 11.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunoconteúdo da enzima tirosina hidroxilase em medula espinhal. Conforme Protocolo experimental 3, ratos wistar foram administrados com MPTP no dia 0 e eutanasiados nos dias 7, 14 e 21 após, a porção lombar da medula espinhal foi removida para a quantificação da técnica de western blot. (A) Imunoconteúdo de TH total (B) Imunoconteúdo do receptor dopaminérgico D1. Os dados estão representados média  $\pm$  EPM e análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle,  $n = 3-5$  por grupo).

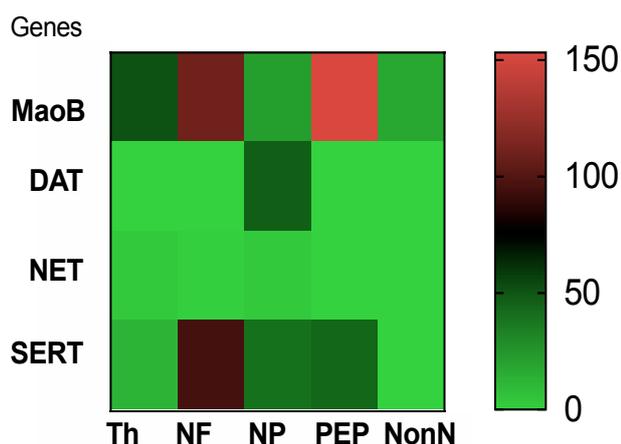
#### **5.4 Avaliação dos mecanismos envolvidos nas alterações nociceptivas induzidas pelo MPTP: ênfase nas alterações em gânglio da raiz dorsal**

Considerando que o sistema nervoso periférico (SNP), incluindo o somatossensorial, também pode ser danificado na DP, foi investigado se alterações a nível de neurônios periféricos sensoriais poderiam contribuir com a hiperalgesia observada nesse modelo animal da DP.

##### **5.4.1. Perfil de expressão gênica de DRGs de camundongos: expressão de proteínas envolvidas com mecanismo de toxicidade do MPTP**

Primeiramente, com o objetivo de confirmar a expressão dos genes de algumas proteínas envolvidas com a atividade dopaminérgica, noradrenérgica e serotoninérgica em DRG, foi realizado uma análise de perfil de expressão gênica, utilizando dados de sequenciamento de RNA de célula única, obtidos de DRG de camundongos C57BL/6J com 6-8 semanas de idade (USOSKIN et al., 2015). Os genes de interesse foram: enzima MAO-B, necessária para a conversão de MPTP em seu metabólito tóxico MPP<sup>+</sup>; DAT, principal responsável pela captação do MPP<sup>+</sup> em neurônios; transportador de noradrenalina (NET) e de serotonina (SERT), os quais também podem transportar MPP<sup>+</sup> para o interior de células (NAMURA et al., 1987).

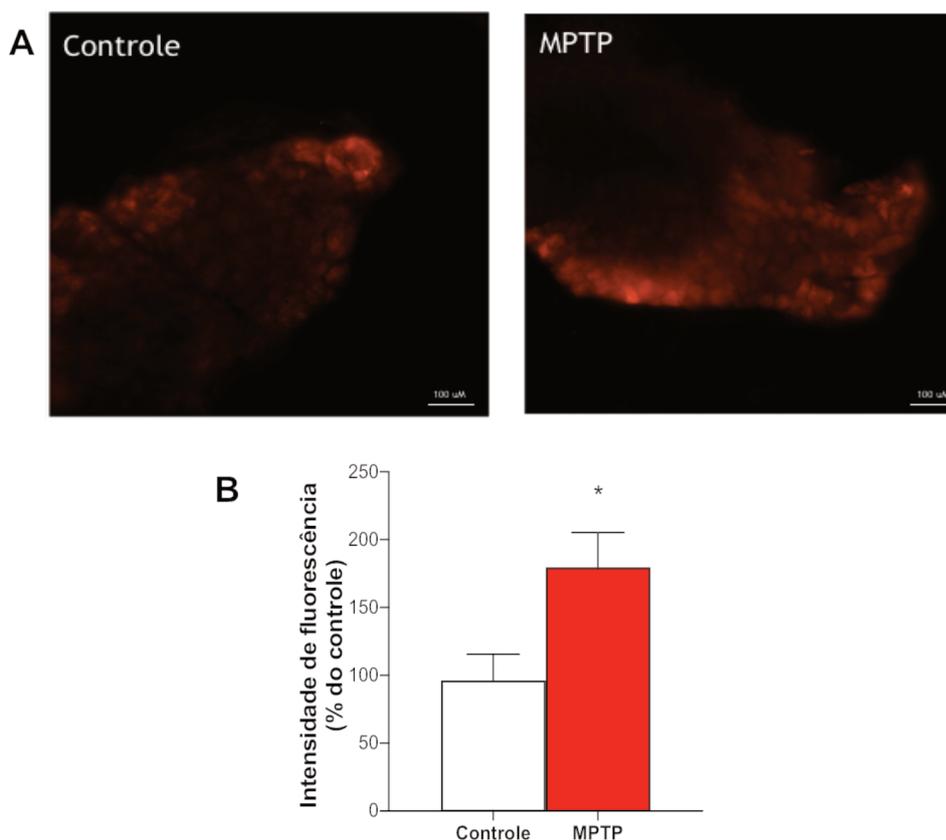
Como resultado, apresentado em forma de mapa de calor na Figura 12, foi observado que o gene da enzima MAOB é expresso em todos os subtipos celulares analisados, apresentando maior expressão em neurônios do tipo peptidérgico e também em neurofilamentos. Já o DAT apresenta maior expressão em neurônios do tipo não-peptidérgicos, enquanto o gene do NET é pouco expresso em todos os tipos celulares. Além disso, observamos que o SERT está expresso em maiores níveis em ambos neurônios peptidérgicos e não-peptidérgicos, bem como em neurofilamentos.



**Figura 12.** Mapa de calor representativo dos níveis de expressão dos transcritos de genes de proteínas envolvidas com o mecanismo de toxicidade do MPTP em DRG de camundongos. Usoskin e colaboradores (2015) utilizou sequenciamento de RNA de células únicas de neurônios do DRG da porção lombar. Genes: monoamina oxidase B (maoB); transportador de dopamina (DAT); transportador de noradrenalina (NET) e de serotonina (SERT). Subtipos celulares: tirosina hidroxilase (Th); neurofilamentos (NF); neurônios não-peptidérgicos (NP); neurônios peptidérgicos (PEP).

#### 5.4.2. Avaliação das alterações em neurônios do gânglio da raiz dorsal induzidas pela administração intranasal de MPTP

Como o objetivo de investigar se a administração i.n. de MPTP pode induzir alterações em DRGs, foi avaliado a formação de ânion superóxido mitocondrial 6 h após a administração do MPTP. Este tempo foi escolhido baseado em estudos prévios que demonstraram ser o pico do dano oxidativo induzido pelo MPTP em regiões encefálicas (PREDIGER et al, 2006). A Figura 13A apresenta imagens representativas de fatias de DRG, e a Figura 13B ilustra a intensidade de fluorescência no filtro vermelho, obtidas após incubação com a sonda mitoSOX. Foi observado que os camundongos administrados com MPTP apresentam um aumento na fluorescência, o que indica maior nível de ânion superóxido em mitocôndrias. A partir deste resultado, podemos sugerir que o MPTP induz alterações em DRG durante as primeiras horas após sua administração pela via i.n..

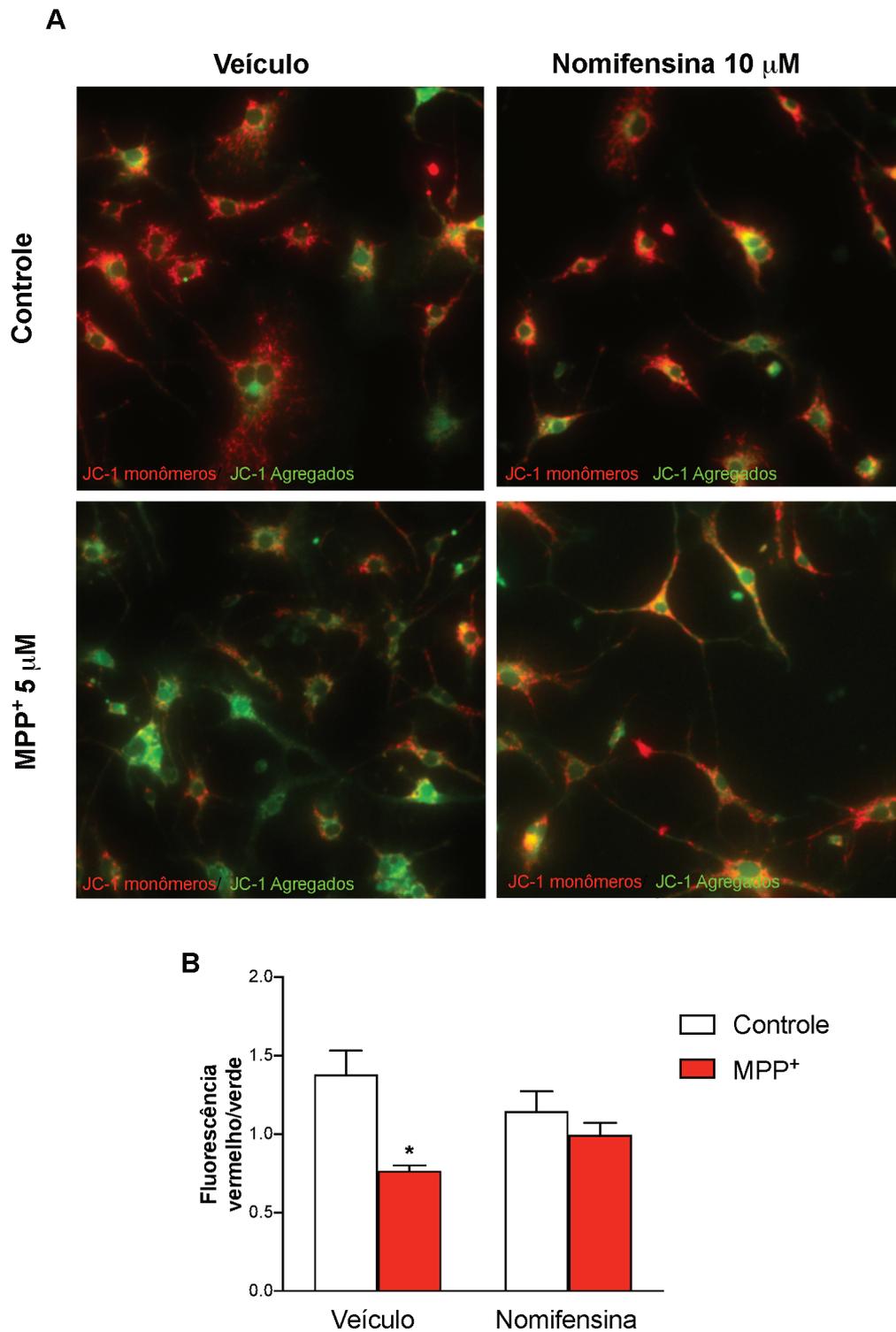


**Figura 13.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre a geração de ânion superóxido em neurônios do gânglio da raiz dorsal de camundongos, 6 h após sua administração. De acordo com o Protocolo experimental 6, os animais foram administrados com MPTP ou salina, e eutanasiados após 6 horas. Os DRGs foram removidos, fatiados e incubados com a sonda mitoSOX por 30 min. (A) imagens representativas do grupo controle e MPTP, (B) Intensidade de fluorescência em relação ao grupo controle. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e análise estatística foi realizada através do teste T student. (\* $p \leq 0,05$  comparado ao grupo veículo  $n=3$  por grupo). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência invertido Nikon Ti2-E, aumento de 20x. Escala= 100  $\mu$ M.

#### 5.4.3. Avaliação dos efeitos do MPP<sup>+</sup> em culturas de neurônios do gânglio da raiz dorsal

Considerando a falta de estudos conclusivos sobre a presença de transportador de dopamina (DAT) nos DRG, avaliou-se *in vitro* se o MPP<sup>+</sup> acessa neurônios do DRG utilizando o DAT. Para isso, foi testado se a inibição do DAT seria capaz de prevenir a neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>. A Figura 14 exibe os resultados obtidos a partir da análise de potencial de membrana mitocondrial, utilizando a sonda JC-1. Como resultado, foi observado que o MPP<sup>+</sup> induz uma diminuição do PMM, indicado por uma diminuição da presença dos monômeros (cor vermelha) e aumento na presença do JC-1 na forma agregada (cor verde). Esse resultado é um indício de dano mitocondrial, que sugere um efeito tóxico do MPP<sup>+</sup> sobre as células. No entanto, quando as células foram previamente tratadas com o inibidor do DAT, nomifensina (10  $\mu$ M), esse efeito

tóxico do MPP<sup>+</sup> foi parcialmente prevenido (Figura 14B), resultado que sugere que o MPP<sup>+</sup> acessa os neurônios do DRG utilizando o DAT.



**Figura 14.** Avaliação da participação do transportador de dopamina (DAT) no mecanismo de toxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup> nos neurônios do gânglio da raiz dorsal. As culturas primárias foram tratadas com veículo ou nomifensina (10  $\mu$ M) por 30 minutos antes da incubação com veículo ou MPP<sup>+</sup> (5  $\mu$ M). Após 20 h, as células foram incubadas com a sonda JC-1. Foram realizados 2 experimentos independentes em triplicata para cada condição... *Continuação na próxima página...*

*Continuação legenda figura 13*

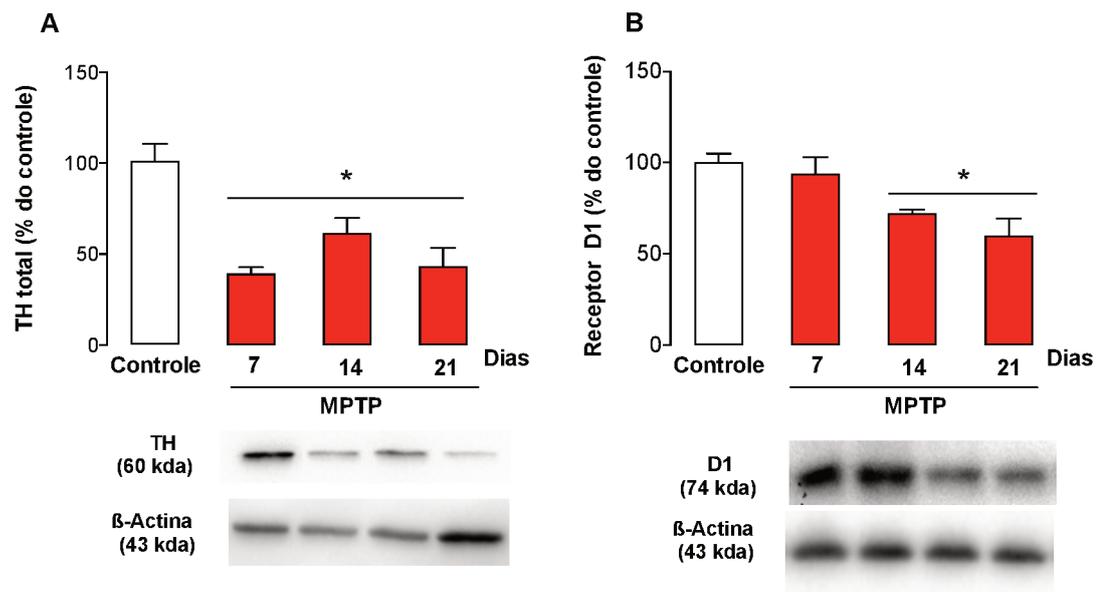
(A) Imagens representativas obtidas após exposição com a sonda, onde vermelho indica a forma monomérica e o verde indica a forma agregada. (B) Os gráficos apresentam a média  $\pm$  E.P.M da intensidade de fluorescência no filtro vermelho dividida pela fluorescência no filtro verde e análise estatística foi realizada através de ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc Newman-Keuls. ( $*p \leq 0,05$  comparado ao grupo veículo). Imagens obtidas em microscópio de fluorescência invertido Nikon Ti2-E, aumento de 20x (Imagens com Zoom 160X).

#### 5.4.4. Avaliação da neurodegeneração em neurônios do *gânglio da raiz dorsal* induzida pela administração intranasal de MPTP

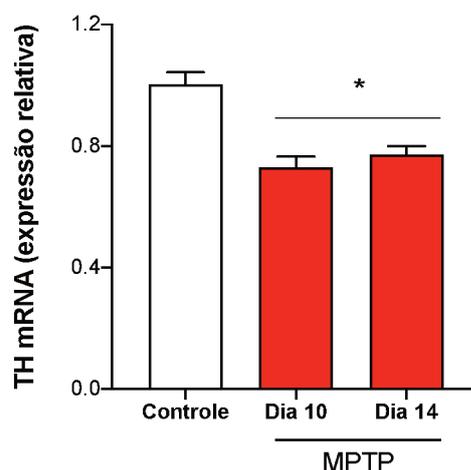
Considerando o mecanismo de toxicidade do MPTP, o qual afeta preferencialmente neurônios dopaminérgicos, foi investigado o efeito da administração i.n. de MPTP sobre a TH, enzima que participa da via de síntese de DA e noradrenalina, em DRG e também de receptores dopaminérgicos do subtipo D1 e D2.

Primeiramente, foi quantificado o imunocontéudo de TH pela técnica de *Western blotting*, o qual está representado na Figura 15A. Foi observado que a administração i.n. do MPTP em ratos Wistar induz uma diminuição significativa nos níveis da enzima TH em todos os tempos avaliados (7, 14 e 21 dias após a administração), sugerindo um dano na neurotransmissão catecolaminérgica em neurônios do DRG. A fim de demonstrar mais especificamente os danos associado a DA, avaliamos a imunocontéudo do receptor dopaminérgico do tipo D1. Foi observado uma redução no conteúdo proteico de receptor D1 no DRG, nos dias 14 e 21 após a administração i.n. do MPTP (Figura 15B), enquanto a imunomarcção para o receptor D2 não foi detectada no DRG (dados não mostrados).

Já em camundongos, foi avaliado os níveis do mRNA da enzima TH nos dias 10 e 14 após a administração de MPTP, resultado apresentado na Figura 16. Foi observado uma diminuição do mRNA para TH no grupo MPTP em relação ao grupo controle, em todos os tempos avaliados. Em conjunto, esses resultados sugerem que a administração i.n. do MPTP induziu alterações a nível de neurônios dopaminérgicos no DRG, evidenciado aqui por uma diminuição do RNA mensageiro da enzima e do imunocontéudo da enzima TH.



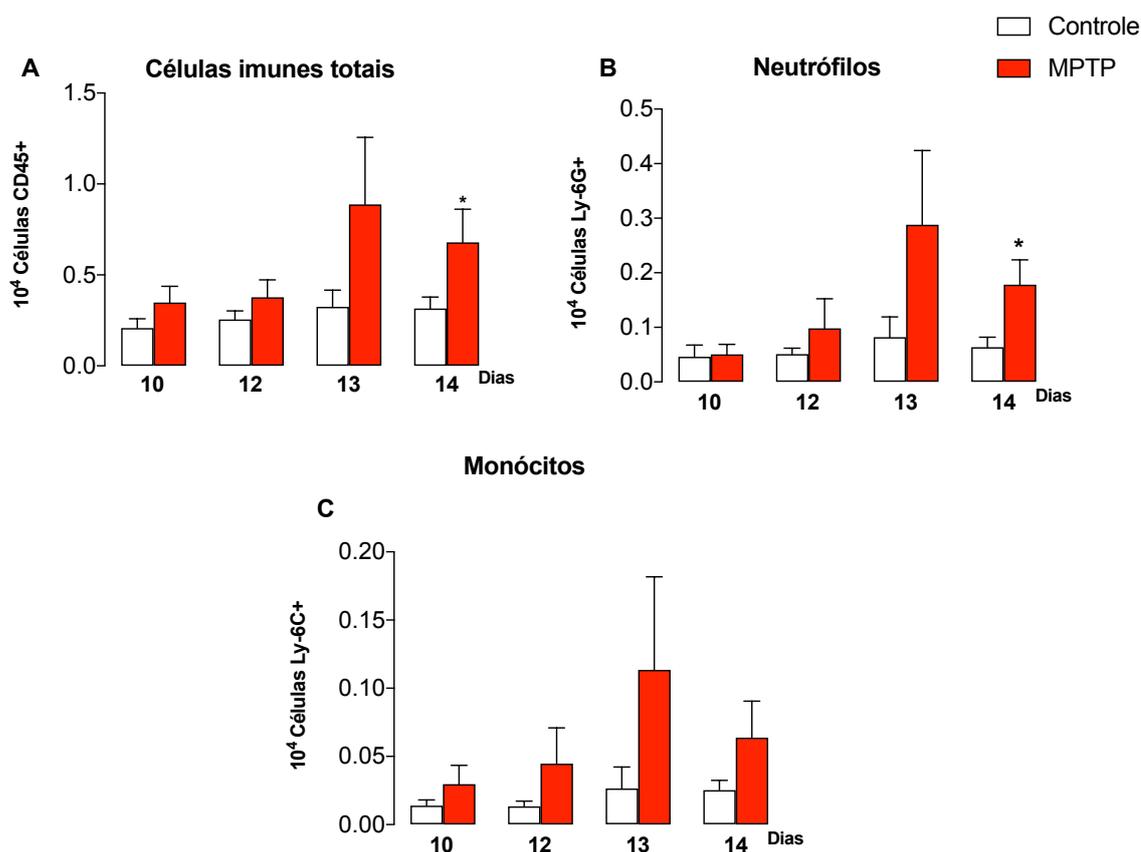
**Figura 15.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunocontéudo da enzima tirosina hidroxilase e do receptor dopaminérgico D1 em neurônios do gânglio da raiz dorsal de ratos. De acordo com o protocolo experimental 3, os ratos Wistar foram administrados com MPTP no dia 0 e eutanasiados nos dias 7, 14 e 21 após. Os DRGs da porção lombar da medula espinhal foram removidos para a execução da técnica de western blot. (A) Imunocontéudo de TH total (B) Imunocontéudo do receptor dopaminérgico D1. Os dados estão representados média + EPM e análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle,  $n = 3-5$  por grupo).



**Figura 16.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre o RNA mensageiro da enzima tirosina hidroxilase (TH), em neurônios do gânglio da raiz dorsal. De acordo com o Protocolo experimental 7, os camundongos foram administrados com MPTP no dia 0 e eutanasiados, os DRGs removidos e os neurônios isolados para realização de PCR quantitativo. Dados apresentados como expressão relativa do grupo controle. Os dados estão representados média  $\pm$  EPM e análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle,  $n = 4$  por grupo).

#### 5.4.5. Avaliação dos efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a resposta imune em neurônios do gânglio da raiz dorsal

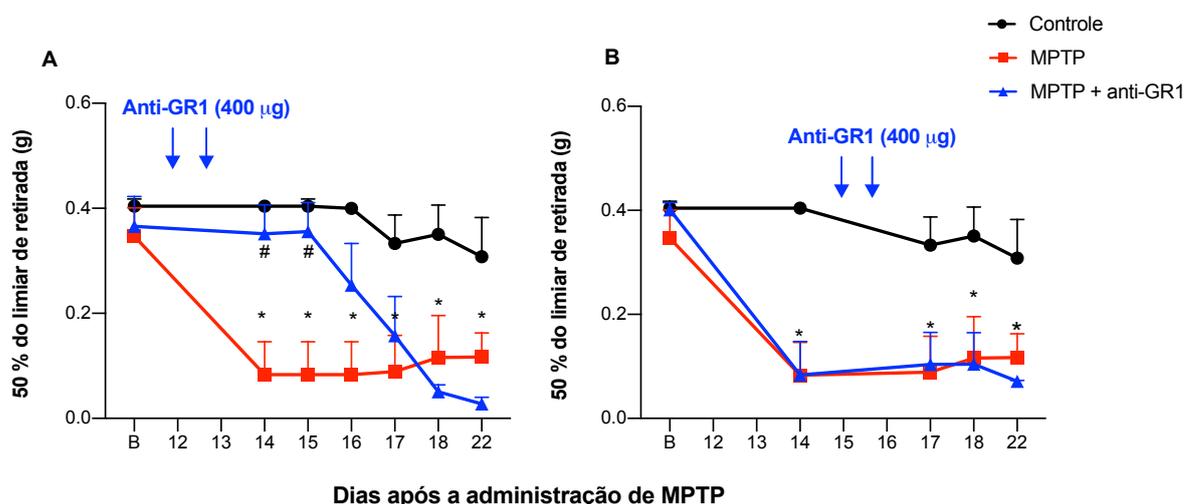
Demonstrado que o MPTP induz alterações nos DRGs, avaliamos se esse processo neurodegenerativo, que se inicia a partir do dia 7 após a administração do MPTP, poderia levar a infiltração de células imunes nos DRG. A Figura 17 exibe os resultados obtidos a partir da análise de citometria de fluxo em DRG, em diferentes dias após a administração i.n. de MPTP. Ocorreu um aumento nos níveis de células CD45<sup>+</sup> a partir do 13º dia após a administração i.n. de MPTP, mas que se mostrou diferente estatisticamente apenas no dia 14º após. Quanto aos tipos celulares, observamos um aumento de neutrófilos e monócitos, sendo que apenas o primeiro, no dia 14º foi estatisticamente significativo.



**Figura 17.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre a infiltração de neutrófilos e monócitos em neurônios do gânglio da raiz dorsal. Conforme o Protocolo experimental 7, camundongos C57BL/6 foram injetados com MPTP ou salina no dia 0. Nos dias 10, 12, 13 e 14 os animais foram eutanasiados e os DRGs coletados para análise por citometria de fluxo. Quantificação do número total de células positivas para CD45<sup>+</sup> (A), Ly-6G<sup>+</sup> (neutrófilos) (B) e Ly-6C<sup>+</sup> (monócitos) (C). Os dados estão representados como média ± EPM e a análise estatística foi realizada através da ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls (\*p<0,05 diferente em relação ao controle no mesmo dia; n= 4-7).

Para avaliar mais diretamente o papel dessas células imunes sobre a hipersensibilidade mecânica, foi realizada a depleção de monócitos e neutrófilos com um anticorpo anti-GR-1 (anti-Ly6G/ Ly6G), conforme protocolo experimental 8. Primeiramente, foram avaliados os efeitos da depleção de neutrófilos/monócitos realizada nos dias 12 e 13 após a administração do MPTP, ou seja, antes do desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica. Como resultado, apresentado na Figura 18A, foi observado que a depleção de neutrófilos/monócitos retardou em 4 dias o aparecimento da hipersensibilidade mecânica, a qual retornou após o 17º dia da administração i.n. do MPTP.

Também foi realizada a depleção com anti-GR-1 nos dias 15 e 16 após a injeção de MPTP, ou seja, depois do estabelecimento do fenótipo da hipersensibilidade mecânica. Como resultado, apresentado na Figura 18B, foi observado que a depleção após o surgimento da dor, não é capaz de modificar esse fenótipo.

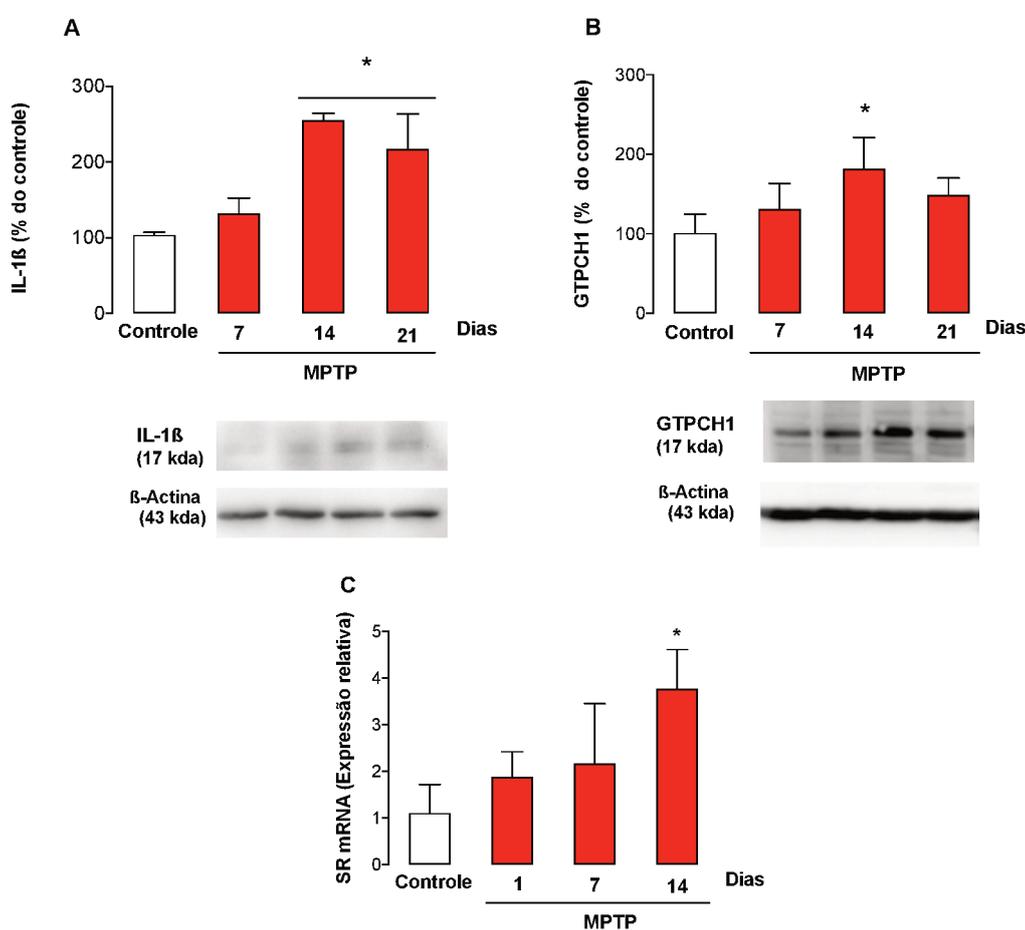


**Figura 18.** Efeito da depleção de neutrófilos/monócitos sobre a alodinia mecânica induzida pela administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) em camundongos. Conforme o Protocolo experimental 8, os animais foram administrados com MPTP ou salina no dia 0 e tratados com anti-Gr-1 (400 ug/200ul; i.p.) em dois diferentes protocolos. Em um dos protocolos, os animais receberam o anti-Gr-1 nos dias 12 e 13 e foram avaliados no teste do von Frey dos dias 14 a 22 após o MPTP (A). Em outro protocolo, os animais receberam anti-Gr-1 nos dias 15 e 16 e foram avaliados no von Frey nos dias 14, 17 a 22 após o MPTP (B). Os gráficos representam os valores de 50 % de limiar de retirada obtidos nos dois diferentes protocolos. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via com medidas repetidas seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $p < 0,05$  diferente em relação ao controle no mesmo dia; #  $p < 0,05$  diferente em relação ao grupo MPTP  $n = 6$  por grupo).

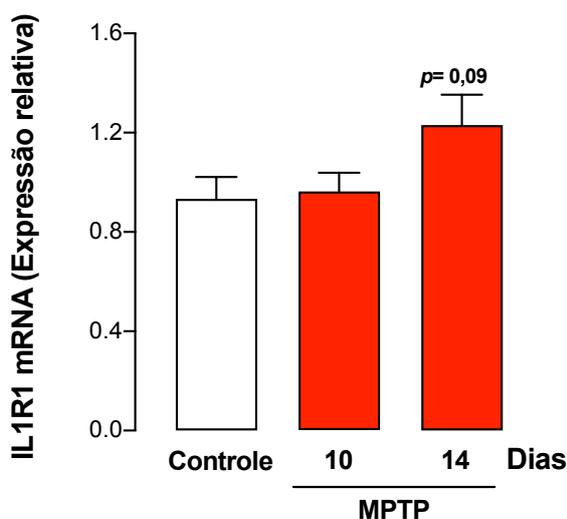
A administração i.n. de MPTP induziu um aumento da proteína IL-1 $\beta$  em DRGs da porção lombar da medula espinal (Figura 19A) em ratos, que foi concomitante com o aparecimento de hiperalgesia nos testes comportamentais (dias 14 e 21 após

MPTP). Já em camundongos, foi quantificado o RNA mensageiro do receptor para IL1 tipo 1 em neurônios dos DRGs, demonstrado na Figura 20, no qual observou-se uma tendência de aumento no 14º dia, sem diferença no 10º dia após a administração do MPTP.

Além do efeito direto dessa citocina nos nociceptores, ela pode participar no aumento da expressão de uma das enzimas regulatórias na síntese da BH4, a GTPCH1, em células imunes, principalmente macrófagos e monócitos (DALE et al., 2009; HAGBERG et al., 2010). De encontro a isso, foi demonstrado um aumento no imunoconteúdo da enzima GTPCH I nos DRGs no dia 14 após a administração i.n. do MPTP (Figura 19B), e um aumento na expressão gênica de uma das enzimas responsáveis pela síntese de novo da BH4, a sepiapterina redutase (SR) (Figura 19C). Em conjunto, esses resultados sugerem um aumento na síntese da BH4 nos DRGs, induzido pelo tratamento com MPTP.



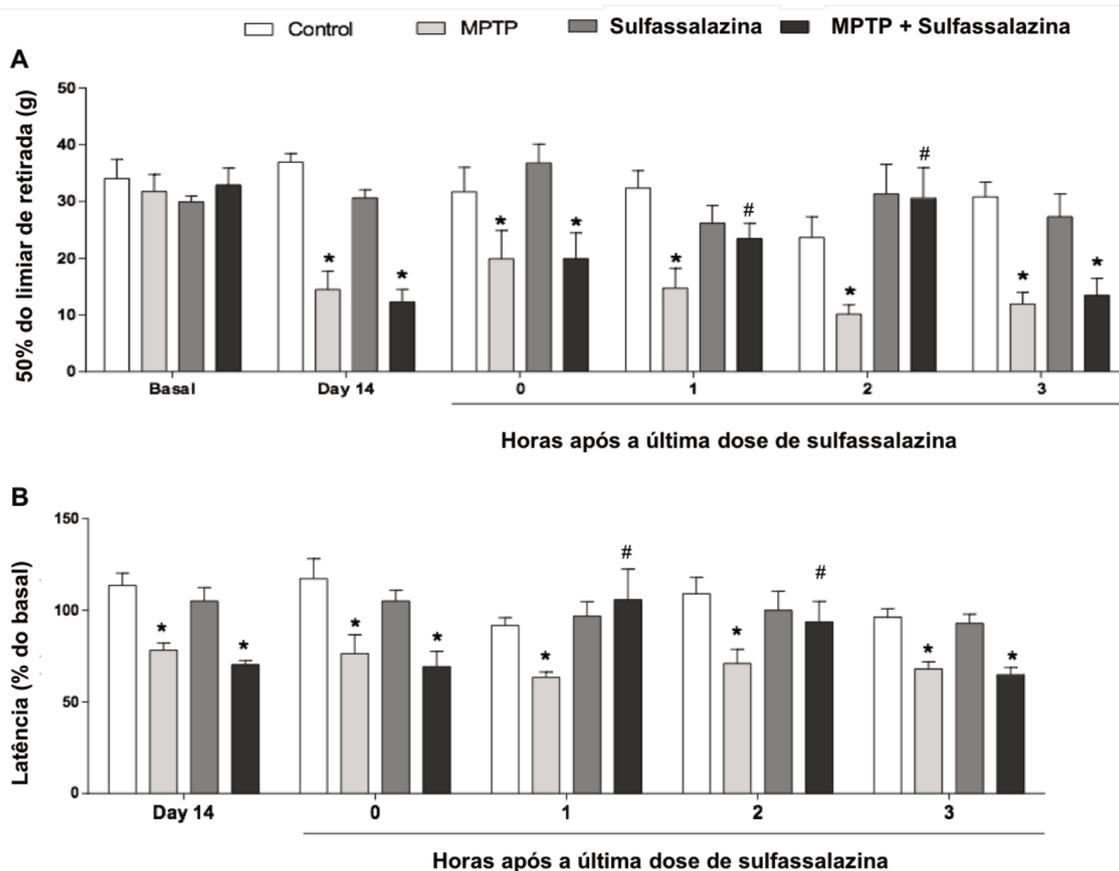
**Figura 19.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (1 mg/narina) sobre o imunoconteúdo da interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (A), da enzima GTP-ciclohidroxilase I (GTPCH I) (B), e o RNA mensageiro para a enzima sepiapterina redutase (SR) (C) em gânglios da raiz dorsal de ratos. Conforme o protocolo experimental 3, os animais foram administrados com MPTP no dia 0 e eutanasiados nos dias 7, 14 e 21 após. Os DRGs da porção lombar da medula espinhal foram removidos para técnica de western blot. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi realizada através ANOVA de uma via seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls ( \* $P$ <0,05 em comparação ao grupo controle, n= 3-5 por grupo).



**Figura 20.** Efeitos da administração i.n. de MPTP (0.5 mg/narina) sobre o RNA mensageiro do receptor de interleucina 1 tipo 1, em neurônios do DRG de camundongos. De acordo com o Protocolo experimental 7, os camundongos foram administrados com MPTP no dia 0 e eutanasiados, os DRGs removidos e os neurônios isolados para realização de PCR quantitativo. Dados apresentados como expressão relativa do grupo controle. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e análise estatística foi realizada através da ANOVA de uma via seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls (\* $p < 0,05$  em comparação ao grupo controle,  $n = 4$  por grupo).

## 5.5 Proposta de uma possível intervenção terapêutica

Com o objetivo de abordar uma possível estratégia terapêutica para a nocicepção induzida pelo MPTP, foi avaliado o efeito do tratamento com um inibidor da enzima sepiapterina redutase, a sulfassalazina (SSZ), sobre o teste do von Frey e placa quente, 17 dias após a administração da MPTP. Como resultado, demonstrado na Figura 21, observou-se que a SSZ aumentou os limiares de resposta nos dois testes avaliados, efeito que se manteve até 2 h após a última administração do inibidor. Sendo assim, esses resultados sugerem o envolvimento da BH4 nas alterações nociceptivas induzidas pelo MPTP.



**Figura 21.** Efeito da administração de sulfassalazina (SSZ), inibidor da síntese de BH4, sobre a hipersensibilidade ao calor e estímulo mecânico induzido pela administração intranasal de MPTP em ratos. Conforme o Protocolo experimental 5, os animais foram administrados com MPTP ou salina no dia 0, no 14<sup>o</sup> dia foram avaliados nos testes de von Frey e placa quente, e em seguida passaram a receber SSZ (50 mg/kg; v.o.) duas vezes ao dia durante 3 dias, e foram avaliados nos mesmos testes comportamentais imediatamente e até 3 horas após a última administração de SSZ. (A) 50% do limiar de retirada no teste do von Frey (B) latência para retirada no teste da placa quente. Os dados estão representados como média  $\pm$  EPM e a análise estatística foi através ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido do teste post-hoc de Newman-Keuls (\*  $P < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo controle no mesmo tempo. #  $P < 0,05$  diferença significativa em relação ao grupo MPTP no mesmo tempo,  $n = 8-9$  por grupo).

## 6 DISCUSSÃO

A dor está entre um dos sintomas não motores mais frequentes da DP, que pode inclusive preceder os sintomas motores em muitos anos (HA; JANKOVIC, 2012; SKOGAR et al., 2012; PONT-SUNYER et al., 2015), sendo relatada como um dos sintomas que mais afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes. Apesar da relevância clínica, ainda é um sintoma muitas vezes negligenciado, principalmente em razão do seu mecanismo pouco compreendido, fato que também justifica a falta de um tratamento eficaz para um número significativo de pacientes. Diante do exposto, existe uma clara necessidade de estudos que permitam o avanço do conhecimento acerca dos mecanismos moleculares e celulares da dor na DP, de maneira especial nas fases pré-motoras/iniciais, pois uma melhor compreensão da mesma pode facilitar tanto a identificação quanto o correto manejo no curso inicial da doença.

Diversos modelos animais vêm sendo utilizados para o estudo da DP. Dentre os modelos existentes, o modelo do MPTP administrado pela via i.n. em roedores vêm se mostrando uma ferramenta útil para o estudo de alterações não motoras da DP. A utilização de modelos animais adequados de acordo com a alteração a ser estudada, no nosso caso a dor nas fases iniciais da DP, é essencial para se elucidar os mecanismos moleculares e celulares. Nesse sentido, no presente trabalho foi utilizado o modelo do MPTP i.n., tanto em ratos wistar como em camundongos C57BL/6J, com o objetivo de caracterizar alterações nociceptivas associadas as fases iniciais pré-motoras da DP, bem como possíveis mecanismos relacionados.

Na primeira parte deste estudo procurou-se caracterizar os efeitos do MPTP sobre a sensibilidade a diferentes estímulos. Em ratos, foi possível observar o desenvolvimento de hipersensibilidade aos estímulos mecânico e térmico (placa quente), a partir do 14º dia. Em contrapartida, não foi encontrado alterações nas respostas ao frio, avaliadas com o teste da acetona. Já em camundongos C57BL/6J, onde foi avaliado a sensibilidade mecânica também por meio do teste de von Frey nos dias 10, 12, 13 e 14, foi possível observar uma maior sensibilidade ao estímulo mecânico, e observamos que a hipersensibilidade mecânica se inicia 13 dias após a administração de MPTP.

Corroborando com nossos achados, diversos estudos em modelos animais da DP também encontraram diminuição nos limiares de resposta frente a estímulos térmicos e mecânicos (DIEB et al., 2014; PARK et al., 2015; CAO et al., 2016; ZHUANG et al., 2016; WANG et al., 2017). Estes achados também estão de acordo com estudos em pacientes, onde uma maior sensibilidade a estímulo mecânico, e principalmente ao calor, são bem definidas (SUNG et al., 2018). Com relação a sensibilidade ao frio, ao nosso conhecimento apenas um estudo, o qual utilizou a injeção de 6-OHDA em ratos, avaliou e descreveu um aumento nas respostas nocifensivas no teste da acetona (GÓMEZ-PAZ et al., 2018). Neste estudo foi utilizado um regime de administração de 6-OHDA (40 µg na SNpc) que desencadeia uma morte

pronunciada de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal (> 90%). De maneira interessante, nesse mesmo estudo foi encontrado que a hipersensibilidade ao frio ocorreu na terceira semana após a injeção de 6-OHDA, enquanto a hipersensibilidade ao calor e ao estímulo mecânico ocorreu uma semana antes. Apesar dos autores não demonstrarem os níveis de lesão na via nigroestriatal no decorrer das semanas, é sabido que a lesão progride e atinge seu nível máximo aproximadamente na terceira semana após a injeção de 6-OHDA. Com isso, podemos sugerir que a falta de hiperalgesia ao frio observada no nosso estudo ocorreu em decorrência de uma menor lesão de neurônios dopaminérgicos na via nigroestriatal (aproximadamente 40% na SNpc). Corroborando com isso, os estudos que avaliaram a sensibilidade ao frio em pacientes com a DP, apresentam uma grande heterogeneidade entre os pacientes (SUNG et al., 2018).

Considerando que os dois testes nos quais observamos que o MPTP induziu hipersensibilidade são dependentes de respostas de reflexo (KAYSER; CHRISTENSEN, 2000), foram avaliadas as respostas dos animais no teste da injeção intraplantar da capsaicina, no qual outras respostas nociceptivas são avaliadas. Esse teste foi também realizado com o objetivo de avaliar a integridade da transmissão nociceptiva mediada pelas fibras nociceptivas do tipo C. A capsaicina ativa os receptores de potencial transiente vaniloide do tipo 1 (TRPV-1), localizados principalmente em fibras nociceptivas aferentes do tipo C no gânglio da raiz dorsal da medula espinal, gânglio trigeminal e no SNC (PALAZZO et al., 2002; JULIUS, 2013). É conhecido que a estimulação de TRPV-1 induz comportamentos relacionados a dor, como lambe, morder e sacudir a pata (SAKURADA et al., 2003; JULIUS, 2013; ISMAIL et al., 2016). Foi observado que a administração de capsaicina *per se* induziu aumento das respostas nociceptivas, e o grupo tratado previamente com MPTP apresentou um aumento significativo das respostas nociceptivas. Essa representa a primeira evidência na literatura de que a administração de uma neurotoxina dopaminérgica pode aumentar respostas nociceptivas induzidas pela capsaicina. Esse resultado indica que a transmissão nociceptiva mediada pelas fibras do tipo C está funcional e, adicionalmente, sugere que o MPTP induz algum mecanismo que aumenta a resposta da capsaicina. Um estudo recente, realizado em cultura de neurônios do DRG de ratos, demonstrou que a DA induz uma diminuição na atividade do TRPV-1 por meio do receptor D1 (CHAKRABORTY et al., 2016). Considerando que o MPTP também reduziu os níveis de D1 nos DRGs no nosso estudo, esse mecanismo de regulação dos TRPV-1 pela DA pode estar comprometido, o que pode levar a um aumento da ativação dos mesmos quando expostos a capsaicina. Por outro lado, essa maior resposta hiperalgésica da capsaicina pode ser apenas um efeito aditivo entre a sensibilidade nociceptiva já apresentada pelo grupo MPTP com a induzida pela capsaicina.

Além dos testes para avaliar a nocicepção, também foi avaliada a atividade locomotora dos animais. Como resultado, foi observado que a administração de MPTP intranasal não provocou alterações significativas nos parâmetros locomotores avaliados no teste do campo aberto. Ainda, o tempo de latência para a queda no rotarod também não foi alterado neste protocolo, indicando a ausência de prejuízos

na coordenação motora e no equilíbrio dos animais. Da mesma forma, não houve alteração no tempo para o animal inverter seu eixo no pole teste, indicando ausência de distúrbios de movimentos, em especial a bradicinesia e perda do tônus muscular. Considerando que as alterações motoras na DP são decorrentes da degeneração na via nigroestriatal, região encefálica responsável pela integração e pelo controle do movimento (BERGER; GASPAR; VERNEY, 1991), também avaliamos a degeneração nessa região. Como esperado, foi observado que os animais que receberam MPTP tiveram uma diminuição de 40% no número de neurônios TH-positivos na SN no 21º dia após o tratamento, além de diminuição de aproximadamente 20% nos níveis de DA no estriado nos dias 14 e 21 após a administração.

O grau de degeneração encontrado no nosso estudo é capaz de justificar a ausência de alterações motoras, pois estima-se que é necessária uma degeneração superior a 80% na SN para que se observem déficits motores em modelos animais da DP (HEUER et al., 2012). Esse alto grau de degeneração para acometimento motor está de acordo com o observado na clínica, onde pacientes exibem os sintomas motores somente quando a degeneração dos terminais nervosos da via nigroestriatal encontra-se entre 70-80% e na SN a degeneração dopaminérgica esteja acima dos 60% (DAUER; PRZEDBORSKI, 2003). Isso é justificado principalmente pelos mecanismos de compensação que os núcleos da base apresentam para a manutenção das funções motoras. Dentre os mecanismos, se destacam a presença de vias dopaminérgicas colaterais, liberação somatodendrítica de DA e feedback negativo sobre os neurônios GABAérgicos estriatais que compensam a degeneração em curso, e também a regulação pré-sináptica sobre a liberação de DA realizada por outras substâncias como acetilcolina, serotonina e glutamato (BEZARD; GROSS, 1998).

Dessa forma, concluímos que o modelo experimental em questão replicou características importantes observadas na DP, como a degeneração da via nigroestriatal, e que as respostas nociceptivas induzidas pela administração i.n. do MPTP foram observadas independentemente de prejuízos motores. De acordo com o proposto por Ugrumov e colaboradores, os resultados encontrados aqui enquadram o modelo do MPTP i.n. como um modelo pré-motor da DP (UGRUMOV et al., 2011). Diante disso, este modelo pode servir como uma ferramenta para o estudo de mecanismos, bem como de intervenções terapêuticas para esse sintoma não motor das fases iniciais da DP. De maneira relevante, os resultados descritos no presente estudo reforçam a hipótese de que a hipersensibilidade nociceptiva de fato pode ser um sintoma não motor que precede as alterações motoras.

Baseado no papel da DA no controle da nocicepção, foi avaliado o efeito da reposição dopaminérgica sobre as alterações nociceptivas. Observou-se que a administração de uma única dose de L-DOPA, no 14º dia após a administração de MPTP, foi capaz de reverter a hipersensibilidade aos estímulos mecânico e térmico induzida pelo mesmo. Esse achado está de acordo com Park e colaboradores, que demonstraram que a reposição dopaminérgica é capaz de reverter ambos os comportamentos (PARK et al., 2015). Estudos utilizando a 6-OHDA em diferentes protocolos também encontraram esse resultado (CAO et al., 2016). Corroborando com

esses dados, estudos clínicos têm demonstrado que fármacos com ação dopaminérgica, como o pramipexol e L-DOPA, são eficazes no alívio da dor na DP (GERDELAT-MAS et al., 2007; BARONE et al., 2010).

Além da via nigroestriatal, as vias descendentes, originadas no tronco encefálico e nas estruturas cerebrais, também desempenham um papel importante na integração e modulação da informação nociceptiva no corno dorsal da medula espinal. É sabido que as monoaminas DA, serotonina e noradrenalina, principais componentes da via descende, modulam a nocicepção via modulação da inibição pré-sináptica (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014). Portanto, foi investigado os níveis destas monoaminas na medula espinal, e os resultados demonstraram que a administração i.n. de MPTP em ratos Wistar induz uma diminuição nos níveis de 5-HT no dia 14 após a administração, alteração que foi normalizada no dia 21, possivelmente por uma resposta compensatória, que induz um aumento de sua síntese em condições de dano (ZHANG, 2016). Essa diminuição de serotonina foi concomitante com o surgimento da hipersensibilidade, o que nos permite sugerir que pode ter contribuído para esse fenótipo comportamental. De fato, a diminuição de 5-HT pode contribuir para a hiperalgesia pela redução da inibição descendente pelos subtipos de receptores 5-HT, ou pela facilitação alterada pela regulação da transmissão inibitória na medula espinal (GARCÍA-RAMÍREZ et al., 2014). Isso vai de acordo com WANG e colaboradores 2017, os quais também demonstraram uma diminuição de 5-HT na medula espinal associada com a hiperalgesia, após administração de 6-OHDA em ratos (WANG et al., 2017).

Também corroborando com Wang e colaboradores, no nosso estudo não foram observadas diferenças nos níveis da noradrenalina e DA na medula. De acordo com esses achados, pode-se sugerir que a sistema dopaminérgico a nível de medula espinal não deve contribuir com a hipersensibilidade térmica e mecânica induzida pela administração do MPTP. Da mesma maneira, Cao e colaboradores também não encontraram modificações nos níveis de DA na medula espinal, após administração de 6-OHDA, mas diferentemente do nosso estudo, estes autores encontraram diminuição nos níveis de noradrenalina (CAO et al., 2016). Essas diferenças entre os estudos podem ser decorrentes das diferenças entre as neurotoxinas MPTP e 6-OHDA. Além dos níveis de monoaminas, também avaliamos o conteúdo proteico da enzima TH, sendo que não encontramos nenhuma alteração, o que reforça a falta de alteração induzida pelo MPTP no sistema dopaminérgico na medula espinal. De maneira similar, PARK e colaboradores, utilizando o modelo MPTP administrado pela via i.p., não encontraram nenhuma alteração em número de neurônios TH positivos na ME (porção ventral e dorsal) (PARK et al., 2015). Em contrapartida, Vivacqua e colaboradores, também utilizando o MPTP i.p., mas em maiores doses, encontraram uma perda neuronal na porção ventral da ME, associada a uma perda de aproximadamente 90% dos neurônios TH<sup>+</sup> da SN (VIVACQUA et al., 2012). Portanto, sugere-se que o dano na medula é dependente da dose de MPTP usada, e estaria vinculado com regimes que induzem maiores níveis de danos dopaminérgicos na via nigroestriatal.

Além da via descendente da dor, a ativação de células da glia na medula também pode estar associada com mecanismos de dor. Citocinas liberadas por essas células imunes, podem induzir um aumento da transmissão sináptica e da atividade neuronal, mecanismos ligados com a um aumento do processo sináptico induzido. Dado o exposto, avaliamos os níveis da forma madura da IL-1 $\beta$  na medula espinhal, mas não encontramos diferença nestes marcadores em nenhum dos tempos avaliados (dias 7, 14 e 21). De encontro a isso, Park e colaboradores, utilizando o modelo do MPTP com administração i.p. não encontraram astrogliose, microgliose, nem maior ativação neuronal nas porções dorsais e ventrais da medula espinhal (PARK et al., 2015), sugerindo que mecanismos de sensibilização central desencadeados por resposta inflamatória na medula, não estariam associados com as alterações nociceptivas encontradas nestes modelos da DP.

Considerando que o SNP, incluindo o somatossensorial, também pode ser danificado na DP, a próxima etapa deste estudo foi investigar se alterações a nível de neurônios periféricos sensoriais, estruturas essenciais para a transdução sensorial, podem contribuir com a hiperalgesia observada nesse modelo animal da DP. Com o objetivo de investigar se o MPTP, após sua administração pela via i.n., pode induzir alterações diretamente em neurônios sensoriais, foi avaliado a formação de ânion superóxido mitocondrial em DRG 6 h após a administração do MPTP. Foi observado que os camundongos administrados com MPTP apresentaram maior dano mitocondrial, indicado pela formação de ânion superóxido. Esse resultado permite sugerir que o MPTP pode acessar DRGs nas primeiras horas após sua administração, induzindo prejuízos celulares significativos. Ao nosso conhecimento, nenhum estudo na literatura demonstrou que o MPTP administrado pela via i.n. pode induzir dano nos neurônios sensoriais. No entanto, um estudo encontrou que essa neurotoxina administrada pela mesma via em ratos pode induzir disfunções no trato gastrointestinal nos primeiros 7 dias após sua administração (SILVA, 2015) indicando que o MPTP administrado por esta via é capaz de induzir alterações em outros órgãos e tecidos além do SNC. Apesar da administração i.n. ter como uma das vantagens facilitar o acesso de moléculas ao SNC (ALCALÁ-BARRAZA et al., 2010), tem se demonstrado que essa via de administração também tem como alvo o SNP (FRANCIS et al., 2009). Corroborando com isso, um estudo que comparou diferentes vias de administração da pregabalina, uma molécula pequena e lipofílica, assim como o MPTP, demonstrou que essa droga pode alcançar os DRGs de ratos após administração i.n. prolongada (MARTINEZ et al., 2012). De fato, a alta irrigação sanguínea presente na cavidade nasal pode conduzir as substâncias administradas por esta via para a circulação, fazendo com que se distribuam sistemicamente (DHURIA; HANSON; FREY, 2010; MUSTAFA et al., 2016).

Também corroborando nossos achados de que o MPTP induz alterações em neurônios sensoriais, um estudo utilizando esta mesma neurotoxina, mas pela via i.p. em camundongos, encontrou um aumento da expressão gênica de canais de sódio Nav1.1, Nav1.7, Nav1.9, e diminuição na expressão gênica dos subtipos Nav1.8 e Nav1.6 em DRG da porção lombar da medula espinhal de camundongos, concomitante com o aumento de nocicepção (DING et al., 2012). Além disso, essa mesma via de

administração também induz alterações no SNE. Em destaque, Coté e colaboradores (2011) demonstraram uma neurodegeneração a nível do plexo mioentérico do íleo distal a partir de 5 dias após a administração de MPTP i.p. em camundongos C57BL/6J, que se mostrou constante 19 dias após a administração do MPTP (CÔTÉ et al., 2011).

Para que o MPTP seja metabolizado em sua forma ativa requer a ação da MAO-B (RANSOM et al., 1987). No SNC, é bem estabelecido que o MPTP é convertido em MPP<sup>+</sup> principalmente em astrócitos e também em neurônios serotoninérgicos (SHEN et al., 1985). Como nenhum estudo ainda demonstrou a metabolização do MPTP a nível de sistema somatossensorial, nossa hipótese foi de que isso pode ocorrer por meio da MAO-B, presente em células gliais satélites (SGC - do inglês "*satellite glial cells*"), mas precisa ser experimentalmente confirmado. A partir da análise de sequenciamento de RNA em célula única de DRGs de camundongos C57 (USOSKIN et al., 2015), observamos que diferentes tipos de células do DRG, incluindo as não neuronais, onde se inclui as SGC, expressam o gene da enzima MAO-B.

Após a conversão em MPP<sup>+</sup>, este precisa acessar o espaço interneuronal. Já é bem estabelecido que o MPP<sup>+</sup> é um substrato do DAT (SHEN et al., 1985), o qual transporta o MPP<sup>+</sup> para o interior dos neurônios. A presença e função do DAT em neurônios sensoriais ainda não foi completamente esclarecida. Enquanto um estudo mostrou que esse transportador não é expresso em neurônios do DRG (BRUMOVSKY; VILLAR; HÖKFELT, 2006), o mRNA foi detectado pelo estudo de USOSKIN et al. (2015), sendo que se encontra mais expresso em neurônios do tipo não-peptidérgicos. De maneira interessante, um estudo recente demonstrou que neurônios não-peptidérgicos parecem ser essenciais para o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica decorrente de uma inflamação em camundongos (PINTO et al., 2019). Portanto, o fato do DAT apresentar maior expressão nesse subtipo neuronal, envolvido com esse tipo de hipersensibilidade mecânica, pode justificar em partes a hipersensibilidade mecânica que observamos após a administração de MPTP nas duas espécies de roedores aqui utilizadas. Estudos que demonstrem os efeitos do MPTP sobre as diferentes populações de neurônios do DRG precisam ser realizados a fim de confirmar essa relação. Dado a falta de estudos conclusivos sobre a presença deste transportador nos DRG, investigamos *in vitro* se o MPP<sup>+</sup> acessa os neurônios do DRG através do DAT. Para isso, foi testado se a inibição do DAT, utilizando nomifensina, seria capaz de prevenir a neurotoxicidade induzida pelo MPP<sup>+</sup>. Os resultados do presente estudo indicaram que a inibição prévia do DAT reduziu parcialmente a toxicidade mitocondrial induzida pelo MPP<sup>+</sup>, resultado que sugere que o mesmo, de fato, acessa os neurônios do DRG utilizando esse transportador.

Uma vez sugerido que os nociceptores apresentam a maquinaria necessária para o metabolismo e ação tóxica do MPTP/MPP<sup>+</sup>, e sabendo do efeito preferencial dessa neurotoxina sobre neurônios dopaminérgicos, foram investigados os efeitos da administração i.n. de MPTP sobre a TH, enzima limitante da síntese de catecolaminas. Foi encontrado que o MPTP induz uma diminuição no imunocontéudo dessa enzima em ratos em todos os tempos avaliados (dias 7, 14, 21), além uma diminuição no

mRNA da TH em camundongos (dias 10 e 14), demonstrando que o MPTP induz alterações a nível de neurônios dopaminérgicos no DRG. Sabe-se que cerca de 15% de todos os neurônios adultos do DRG expressam a TH (BRUMOVSKY; VILLAR; HÖKFELT, 2006; USOSKIN et al., 2015; ALBISETTI et al., 2017). São neurônios pequenos em tamanho, que basicamente não se co-expressam com neurônios peptidérgicos e não-peptidérgico (ALBISETTI et al., 2017), o que sugere que são uma subpopulação distinta de neurônios, sem fenótipo ainda bem caracterizado. Apesar de não ter evidências do papel destes neurônios TH<sup>+</sup> na transdução da dor, estudos têm demonstrado que a DA, produto final dessa enzima, exerce efeitos modulatórios na atividade elétrica em neurônios de menor espessura em DRGs através do seu receptor D1 (GALBAVY et al., 2013). Esses estudos têm demonstrado que a ativação desse receptor pode induzir uma inibição em diferentes canais expressos em neurônios sensoriais, como TRPV1 (CHAKRABORTY et al., 2016) e canais de sódio TTX-R presentes em neurônios sensoriais de diâmetro pequeno (GALBAVY et al., 2013). No nosso estudo encontramos também uma diminuição significativa de receptores dopaminérgicos D1 nos ratos administrados com MPTP, o que permite sugerir a existência de uma maior atividade de neurônios envolvidos com a transdução da nocicepção.

Estas novas evidências de que o MPTP é capaz de induzir danos também nos nociceptores, e que isso precederia o aparecimento de alterações motoras decorrentes de alterações principalmente na via nigroestriatal, reforçam a hipótese de Braak. De acordo com essa hipótese, os depósitos de  $\alpha$ -sinucleína se iniciariam fora do SNC, mais especificamente em nervos periféricos do sistema nervoso entérico e autonômico, e que se espalhariam de forma ascendente para o tronco encefálico e mesencefálico e, finalmente, alcançaria estruturas corticais (BRAAK et al., 2003). Apesar dos estudos de Braak darem enfoque para o início das alterações principalmente no sistema nervoso entérico, autonômico, e também olfatório, vêm crescendo o número de evidências que provam que as fibras sensoriais também podem ser alvo da DP ainda nas fases iniciais (REICHLING; LEVINE, 2011).

Além disso, a hipótese do limiar funcional, proposta mais recentemente (ENGELENDER; ISACSON, 2017), também pode explicar essas alterações que encontramos a nível de nociceptores. Essa hipótese afirma que o SNP apresentaria déficits em estágios iniciais da doença por conta da sua menor complexidade circuitaria, quando comparado com estruturas do SNC, como a circuitaria dopaminérgica no encéfalo para o controle e início do movimento, sugerindo que neurônios do SNP teriam menor reserva funcional. Ou seja, de acordo com esses autores, as alterações patológicas na DP iniciariam simultaneamente em diferentes regiões, mas os sintomas decorrentes de alterações no SNP aparecem antes devido a um menor limiar funcional, o que explicaria a progressão dos sintomas iniciais da doença. Portanto, essa teoria da progressão ascendente poderia representar uma combinação tanto da vulnerabilidade quanto da reserva funcional dos neurônios afetados. Consequentemente, os sintomas iniciais da DP podem refletir a perda de função de sistemas menos compensados, como trato GI, sistema olfatório, sistema somatossensorial e tronco encefálico (ENGELENDER; ISACSON, 2017).

Demonstrado que o MPTP induz dano em neurônios do DRG, avaliamos se esse processo, que tem início pelo menos 7 após a administração de MPTP, poderia estar acompanhado por respostas imunes nos DRGs. De fato, o dano neuronal está geralmente associado ao recrutamento de células imunes para o local da lesão, resultando em inflamação (WOFFORD; LOANE; CULLEN, 2019). Além do mais, diversos estudos já demonstraram que a neuroinflamação é um dos fatores associados com a neurodegeneração tanto em pacientes quanto em modelos animais da DP (para revisão ver: KANNARKAT; BOSS; TANSEY, 2013). No presente estudo, observamos uma tendência de aumento de células imunes (CD45<sup>+</sup>), majoritariamente neutrófilos, em DRGs a partir do 13º dia, que foi estatisticamente significativa no dia 14. De fato, é conhecido que o MPTP induz uma série de alterações no sistema imune inato no cérebro, como a ativação microglial (SUGAMA et al., 2003). A nível de SNP, Côté e colaboradores (2011) demonstraram que o MPTP administrado pela via i.p. induz infiltração de macrófagos, neutrófilos e monócitos no plexo mientérico.

Com relação ao decurso temporal das alterações imunes, os trabalhos que avaliam no SNC, mostram que estas alterações ocorrem nos primeiros dias após a administração e são transitórias. De fato, com o modelo do MPTP i.n. em ratos Wistar, não foram encontradas diferenças nos níveis de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios (TNF, IL-1 $\beta$ , IL-10) em regiões encefálicas após 21 dias da administração (CASTRO et al., 2013). No entanto, no nosso trabalho encontramos que estas alterações nos DRGs iniciam 13 dias após a administração do MPTP. Ao nosso conhecimento, até o momento apenas um estudo utilizando MPTP em roedores avaliou alterações imunes em SNP, mais precisamente em SNE, que como já mencionado, encontrou alterações que persistem por pelo menos 19 dias (CÔTÉ et al., 2011). Portanto, o nosso achado, somado ao achado de Côté e colaboradores, fornece indícios de que existe um diferente perfil de resposta imune entre o SNP e o SNC onde a nível de periferia as alterações imunes persistem por um tempo maior. Uma provável explicação para isso pode ser a ausência de barreira hematoencefálica, fator que facilitaria a infiltração de células no SNP.

A fim de avaliar mais diretamente o papel dessas células imunes sobre a hipersensibilidade mecânica, foi realizada a depleção das mesmas com um anticorpo anti-GR-1. Como resultado, foi observado que a depleção de neutrófilos/monócitos prévia ao desenvolvimento da hipersensibilidade mecânica (dias 12 e 13) retardou em 4 dias o aparecimento da mesma, a qual apareceu após o 17º dia da injeção do MPTP. Este resultado sugere que essas células imunes podem contribuir com o início das alterações nociceptivas observadas no nosso modelo. Quanto ao aparecimento tardio do fenótipo de alodínia, este poderia ser justificado pelo retorno dos neutrófilos/monócitos, pelo surgimento de outras células imunes ou ainda por mecanismos supraespinhais/espinhais que também encontramos modificados no nosso modelo. Experimentos que avaliem o perfil de células imunes após a depleção são necessários para esclarecer esses nossos achados. Por outro lado, quando a depleção foi realizada após o fenótipo da hipersensibilidade mecânica já estar estabelecido, a depleção com anti-GR-1 não foi capaz de modificar este comportamento nociceptivo. Esse resultado sugere que fatores liberados antes da

depleção, como por exemplo citocinas inflamatórias, já estariam exercendo seus efeitos de sensibilização sobre os neurônios.

Um possível mecanismo pelo qual a infiltração dessas células imunes nos gânglios sensoriais pode contribuir com a nocicepção é através da produção de mediadores inflamatórios (RITTNER; BRACK, 2007). De fato, neutrófilos e monócitos podem infiltrar nervos e gânglios sensoriais, após danos nos mesmos, e produzir mediadores algésicos, como citocinas TNF, IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6, PGE2, radicais livres, metaloproteases e prótons (CUNHA et al., 2008; GUERRERO et al., 2008). Em especial, a produção das citocinas inflamatórias nos gânglios sensoriais desempenha um papel importante na gênese das condições de dor inflamatória e neuropática, por sensibilizar os neurônios do DRG, produzindo uma hiperexcitabilidade dos mesmos (TAKEDA et al., 2007; STEMKOWSKI; SMITH, 2012; STEMKOWSKI et al., 2015). No nosso estudo, encontramos um aumento da proteína IL-1 $\beta$  em DRGs de ratos, nos dias 14 e 21 após o tratamento com MPTP, enquanto que em camundongos, observamos um aumento da expressão do receptor para IL-1 no dia 14. Outros estudos com MPTP i.p. em camundongos, já demonstraram aumento de IL-1 $\beta$ , TNF e IL-6 em sangue e regiões encefálicas (BIAN et al., 2009; LOFRUMENTO et al., 2010; PISANU et al., 2014). A quantificação de IL-1 $\beta$ , assim como outras citocinas, nos neutrófilos, bem como nos DRGs após a depleção com o anti-Gr-1, poderá confirmar se elas são de fato proveniente destas células imunes. Além disso, o bloqueio dessa citocina com um inibidor específico, poderá confirmar seu papel sobre a nocicepção em nosso modelo.

Em conjunto, encontramos que a interação neuro-imune pode contribuir em partes para o desenvolvimento de hipersensibilidade nociceptiva na DP, pois as mesmas ocorreram concomitantemente com o início da hipersensibilidade. Nossa hipótese é que o processo de morte neuronal ou dano celular desencadeado pelo MPTP, provoca uma resposta imune e uma liberação de quimiocinas, e componentes por estas células imunes que podem induzir a sensibilização dos nociceptores, tornando-os mais sensíveis a estímulos mecânicos e térmicos. Corroborando nossa hipótese, um estudo recente demonstrou ativação imune e dano neuronal associados com uma sensibilização periférica em um modelo de esclerose múltipla, que classicamente induz alterações a nível de SNC (YOUSUF et al., 2019).

Como mencionado anteriormente, sabe-se que a o aumento da IL-1 $\beta$  pode induzir um aumento na expressão de uma das enzimas regulatórias na síntese da BH4, a GTPCH1 e o aumento deste cofator esta relacionado a dor na DP. Em nossos resultados, observamos que além desse aumento da IL-1 $\beta$ , foi encontrado um aumento no imunoconteúdo da enzima GTPCH I nos DRGs no dia 14 após a administração i.n. do MPTP em ratos e um aumento na expressão gênica de uma das enzimas responsáveis pela síntese de novo da BH4, a SR. Estes resultados são sugestivos de um aumento na síntese da BH4 nos DRG, apesar de não ser possível afirmar que este aumento de fato esteja ocorrendo. Estudos com modelos de dor neuropática e inflamatória também já encontraram um aumento na expressão destas e outras enzimas envolvidas com a síntese da BH4 em DRGs (COSTIGAN et al., 2002; LATREMOLIERE et al., 2015). Portanto, sabendo do papel de inibidores da síntese

da BH4 vêm sendo testados em estudos pré-clínicos e clínicos como estratégia terapêutica para o alívio da dor (revisado por COSTIGAN; LATREMOLIERE; WOOLF, 2012). Neste estudo, foi utilizado um inibidor da enzima sepiapterina redutase, a sulfasalazina, e observou-se uma diminuição na hiperalgesia induzida pelo MPTP i.n. frente a estímulo mecânico e térmico (calor), efeito que se manteve até duas horas após a última administração do inibidor. A sulfasalazina é uma droga antiinflamatória utilizada na clínica principalmente para tratamento de doenças intestinais, e que foi mostrada como um inibidor da enzima sepiapterina redutase, uma das enzimas da síntese de novo da BH4 (CHIDLEY et al., 2011). Sendo assim, estes resultados reforçam o envolvimento da BH4 com condições de hiperalgesia e demonstram pela primeira vez a participação desta via nas alterações nociceptivas observadas em modelo animal das fases iniciais da DP, mas mais estudos ainda precisam ser desenvolvidos para melhor caracterizar essa relação.

## 7 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- A administração i.n. de MPTP intranasal induz aumento da sensibilidade frente a estímulo mecânico e ao calor, sem alterações na sensibilidade ao frio em ratos e também sem alterar comportamentos motores em ratos;
- O tratamento com um repositivo dopaminérgico, L-DOPA, reverte a hipersensibilidade térmica e mecânica induzida pelo MPTP em ratos;
- A administração i.n. de MPTP não induz alterações nos níveis DA e noradrenalina, e nem no mediador inflamatório IL-1 $\beta$  na medula espinhal de ratos;
- A administração i.n. de MPTP induz uma diminuição transitória nos níveis de serotonina na medula espinhal de ratos;
- A administração i.n. de MPTP induz dano dopaminérgico no DRG de ratos e camundongos;
- A administração i.n. de MPTP induz infiltração de neutrófilos em DRG de camundongos, concomitante com o aparecimento de hipersensibilidade mecânica;
- A administração i.n. de MPTP induz aumento do imunoconteúdo de IL-1 $\beta$  em ratos, e aumento do mRNA para o seu receptor em camundongos;
- Por fim, a administração i.n. de MPTP induz um aumento do imunoconteúdo para a GTPCH1, e também do mRNA para a enzima sepiapterina redutase. E o tratamento com um inibidor da síntese da BH4, foi capaz de reverter a hipersensibilidade térmica e mecânica induzida pelo MPTP em ratos.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este trabalho demonstrou, pela primeira vez, que um modelo animal da DP induzido pela administração i.n. de MPTP, induz alterações nociceptivas do tipo hiperalgesia a estímulo térmico (calor) e mecânico, bem como maiores respostas nociceptivas no teste da capsaicina intraplantar, e que estas alterações ocorrem independentemente de alterações motoras clássicas do modelo. Isso caracteriza o nosso modelo como uma ferramenta útil para o estudo das alterações nociceptivas das fases prodromicas da DP.

Com relação aos mecanismos possivelmente envolvidos com esse fenótipo, encontramos evidências de modificações nos três níveis de processamento da dor: nociceptores, medula espinhal e também supraespinhal (via nigroestriatal). Assim, a dor nas fases iniciais da DP pode ser consequência de estímulos sensoriais anormais decorrentes de danos nos nociceptores, que inclusive pode estar associado a infiltração de células imunes, somada a alterações no SNC que podem prejudicar ainda mais o processamento nociceptivo. Em destaque, este é o primeiro trabalho utilizando um modelo animal da DP, que demonstra alterações a nível dopaminérgico e inflamatório em gânglios da raiz dorsal, mostrando a importância em se levar em conta esse tipo de alterações quando se estuda nocicepção em modelos da DP. Por fim, ainda caracterizamos de maneira pioneira o envolvimento da via do cofator BH4 nas alterações nociceptivas observadas em um modelo animal da DP. Dado a falta de um tratamento específico, abrimos a possibilidade de uma nova abordagem terapêutica para tratar esses sintomas.

## REFERÊNCIAS

ALBISETTI, G. W. et al. Identification of Two Classes of Somatosensory Neurons That Display Resistance to Retrograde Infection by Rabies Virus. **The Journal of neuroscience**, v. 37, n. 43, p. 10358–10371, 25 out. 2017.

ALCALÁ-BARRAZA, S. R. et al. Intranasal delivery of neurotrophic factors BDNF, CNTF, EPO, and NT-4 to the CNS. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, n. 3, p. 179–190, 6 abr. 2010.

ALEXANDER, G. E.; CRUTCHER, M. D. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. **Trends in neurosciences**, v. 13, n. 7, p. 266–71, jul. 1990.

ALEXANDER, G. E.; DELONG, M. R.; STRICK, P. L. Parallel Organization of Functionally Segregated Circuits Linking Basal Ganglia and Cortex. **Annual Review of Neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 357–381, mar. 1986.

ALLEN, N. E. et al. The association between Parkinson's disease motor impairments and pain. **Pain Medicine**, 2016.

ARYAL, B. et al. Alteration of Striatal Tetrahydrobiopterin in Iron-Induced Unilateral Model of Parkinson's Disease. **The Korean journal of physiology & pharmacology**, v. 18, n. 2, p. 129–34, 1 abr. 2014.

AUSTIN, P. J.; MOALEM-TAYLOR, G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: Involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines. **Journal of Neuroimmunology**, v. 229, n. 1–2, p. 26–50, 15 dez. 2010.

BAIG, F. et al. Delineating nonmotor symptoms in early Parkinson's disease and first-degree relatives. **Movement Disorders**, v. 30, n. 13, p. 1759–1766, nov. 2015.

BARONE, P. et al. Pramipexole for the treatment of depressive symptoms in patients with Parkinson's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 6, p. 573–580, jun. 2010.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 1 jun. 2012.

BARTELS, A. L. et al. [11C]-PK11195 PET: Quantification of neuroinflammation and a monitor of anti-inflammatory treatment in Parkinson's disease? **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 16, n. 1, p. 57–59, jan. 2010.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–84, 16 out. 2009.

BASSO, D. M.; BEATTIE, M. S.; BRESNAHAN, J. C. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats. **Journal of neurotrauma**, v. 12, n. 1, p. 1–21, fev. 1995.

BEISKE, A. G. et al. Pain in Parkinson's disease: Prevalence and characteristics. **Pain**, 2009.

BERGER, B.; GASPAR, P.; VERNEY, C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates. **Trends in neurosciences**, v. 14, n. 1, p. 21–7, jan. 1991.

BERTA, T. et al. Targeting dorsal root ganglia and primary sensory neurons for the treatment of chronic pain. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 21, n. 7, p. 695–703, 2017.

BEZARD, E. Neuroprotection for Parkinson's Disease. Clinically Driven

Experimental Design in Non-human Primates. In: **Parkinson's Disease**. p. 65-75, 2008.

BEZARD, E.; GROSS, C. E. Compensatory mechanisms in experimental and human parkinsonism: towards a dynamic approach. **Progress in neurobiology**, v. 55, n. 2, p. 93–116, jun. 1998.

BEZARD, E.; GROSS, C. E.; BROTHIE, J. M. Presymptomatic compensation in Parkinson's disease is not dopamine-mediated. **Trends in Neurosciences**, 2003. .

BIAN, M. Juan et al. Elevated interleukin-1 $\beta$  induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine aggravating dopaminergic neurodegeneration in old male mice. **Brain Research**, 2009.

BLANCHET, P. J.; BREFEL-COURBON, C. Chronic pain and pain processing in Parkinson's disease. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 87, n. Pt B, p. 200–206, 20 dez. 2018.

BLANDINI, F. et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Progress in neurobiology**, v. 62, n. 1, p. 63–88, set. 2000.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, 2014.

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

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell and Tissue Research**, v. 318, n. 1, p. 121–134, 24 out. 2004.

BREFEL-COURBON, C. et al. Effects of levodopa on pain threshold in Parkinson's disease: A clinical and positron emission tomography study. **Movement Disorders**, v. 20, n. 12, p. 1557–1563, 2005.

BROCHARD, V. et al. Infiltration of CD4+ lymphocytes into the brain contributes to neurodegeneration in a mouse model of Parkinson disease. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 1, p. 182–192, 2009.

BRUMOVSKY, P.; VILLAR, M. J.; HÖKFELT, T. Tyrosine hydroxylase is expressed in a subpopulation of small dorsal root ganglion neurons in the adult mouse. **Experimental Neurology**, v. 200, n. 1, p. 153–165, jul. 2006.

BURKEY, A. R.; CARSTENS, E.; JASMIN, L. Dopamine Reuptake Inhibition in the Rostral Agranular Insular Cortex Produces Antinociception. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 10, 1999.

CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 8, p. 1022–1030, 28 ago. 2014.

CAO, L.-F. et al. Restoring Spinal Noradrenergic Inhibitory Tone Attenuates Pain Hypersensitivity in a Rat Model of Parkinson's Disease. **Neural Plasticity**, v. 2016, p. 1–16, 26 set. 2016.

CASTRO, A. A. et al. Lithium and valproate prevent olfactory discrimination and short-term memory impairments in the intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) rat model of Parkinson's disease. **Behavioural Brain Research**, v. 229, n. 1, p. 208-15, jan. 2012.

CASTRO, A. A. et al. Atorvastatin improves cognitive, emotional and motor impairments induced by intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in rats, an experimental model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1513, p. 103–116, 4 jun. 2013.

CHAKRABORTY, S. et al. Dopamine modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) receptor in dorsal root ganglia neurons. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 6, p. 1627–1642, 2016.

CHAPLAN, S. R. et al. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **Journal of neuroscience methods**, v. 53, n. 1, p. 55–63, jul. 1994.

CHEN, Y. et al. Quantitative and fiber-selective evaluation of pain and sensory dysfunction in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 21, n. 4, p. 361–365, 2015.

CHIDLEY, C. et al. A yeast-based screen reveals that sulfasalazine inhibits tetrahydrobiopterin biosynthesis. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 6, p. 375–383, 17 jun. 2011.

CONNOLLY, B. S.; LANG, A. E. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 311, n. 16, p. 1670–83, 23 jan. 2014.

COSTIGAN, M. et al. Replicate high-density rat genome oligonucleotide microarrays reveal hundreds of regulated genes in the dorsal root ganglion after peripheral nerve injury. **BMC neuroscience**, p. 16, 25 out. 2002.

COSTIGAN, M.; LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Analgesia by inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 1, p. 92–99, 2012.

CÔTÉ, M. et al. The critical role of the MyD88-dependent pathway in non-CNS MPTP-mediated toxicity. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 25, n. 6, p. 1143–1152, 1 ago. 2011.

CRAIG, A. D. A new version of the thalamic disinhibition hypothesis of central pain. **Pain Forum**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 1 mar. 1998.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 22 jan. 2008.

DALE, R. C. et al. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: A marker of active central nervous system inflammation. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 51, n. 4, p. 317–323, 2009.

DAUER, W.; PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. **Neuron**, v. 39, n. 6, p. 889–909, 11 set. 2003.

DEFAZIO, G. et al. Pain as a Nonmotor Symptom of Parkinson Disease. **Archives of Neurology**, v. 65, n. 9, p. 1191–4, 1 set. 2008.

DEMAAGD, G.; PHILIP, A. Parkinson's disease and its management part 2: Introduction to the pharmacotherapy of Parkinson's disease, with a focus on the use of dopaminergic agents. **Pharmacy and therapeutics**, v. 40, p. 590-600, sep. 2015.

DEUIS, J. R.; DVORAKOVA, L. S.; VETTER, I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. **Frontiers in molecular neuroscience**, v. 10, p. 284, 2017.

DEVIGILI, G. et al. Levodopa/carbidopa intestinal gel therapy for advanced Parkinson Disease: AN early toxic effect for small nerve fibers? **Muscle and Nerve**, 2016.

DEVOR, M. Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion. **Pain**, 1999.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 4, p. 1654–1673, abr. 2010.

DIEB, W. et al. Lesion of the dopaminergic nigrostriatal pathway induces trigeminal dynamic mechanical allodynia. **Brain and Behavior**, v. 4, n. 3, p. 368–380, 2014.

DING, H. et al. Alterations of gene expression of sodium channels in dorsal root ganglion neurons of estrogen receptor knockout (ERKO) mice induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Endocrine**, v. 42, n. 1, p. 118–124, 2012.

DIXON, W. J. The Up-and-Down Method for Small Samples. **Journal of the American Statistical Association**, v. 60, n. 312, p. 967–978, dez. 1965.

DJALDETTI, R. et al. The effect of duloxetine on primary pain symptoms in Parkinson disease. **Clinical neuropharmacology**, v. 30, n. 4, p. 201–5, 2007.

DJALDETTI, R. et al. Quantitative measurement of pain sensation in patients with Parkinson disease. **Neurology**, v. 22, p. 2171–5, jun. 2004.

DONADIO, V. et al. Skin nerve  $\alpha$ -synuclein deposits: A biomarker for idiopathic Parkinson disease. **Neurology**, v. 82, n. 15, p. 1362–1369, 15 abr. 2014.

DORSEY, E. R. et al. Projected number of people with Parkinson disease in the most populous nations, 2005 through 2030. **Neurology**, v. 68, n. 5, p. 384–6, 30 jan. 2007.

DORSEY, E. R.; BLOEM, B. R. The Parkinson Pandemic—A Call to Action. **JAMA Neurology**, v. 75, n. 1, p. 9, 1 jan. 2018.

EHRT, U.; LARSEN, J. P.; AARSLAND, D. Pain and its relationship to depression in parkinson disease. **American Journal of Geriatric Psychiatry**, 2009.

ENGELENDER, S.; ISACSON, O. The Threshold Theory for Parkinson's Disease. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 1, p. 4–14, jan. 2017.

FRANCIS, G. et al. Intranasal insulin ameliorates experimental diabetic neuropathy. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 934–45, abr. 2009.

GALBAVY, W. et al. Inhibition of Tetrodotoxin-Resistant Sodium Current in Dorsal Root Ganglia Neurons Mediated by D1/D5 Dopamine Receptors. **Molecular Pain**, v. 9, p. 1744–8069–9–60, 22 jun. 2013.

GALVAN, A.; WICHMANN, T. Pathophysiology of Parkinsonism. **Clinical Neurophysiology**, 2008. .

GARCÍA-RAMÍREZ, D. L. et al. Serotonin, dopamine and noradrenaline adjust actions of myelinated afferents via modulation of presynaptic inhibition in the mouse spinal cord. **PLoS one**, v. 9, n. 2, p. e89999, 2014.

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

GERDELAT-MAS, A. et al. Levodopa raises objective pain threshold in Parkinson's disease: a RIII reflex study. **J Neurol.Neurosurg.Psychiatry**, v. 78, n. 1468– 330X (Electronic), p. 1140–1142, 2007.

GERHARD, A. et al. In vivo imaging of microglial activation with [11C](R)-PK11195 PET in idiopathic Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, v. 21, n. 2, p. 404–412, fev. 2006.

GIBRAT, C. et al. Differences between subacute and chronic MPTP mice models: Investigation of dopaminergic neuronal degeneration and  $\alpha$ -synuclein inclusions. **Journal of Neurochemistry**, 2009.

GÓMEZ-PAZ, A. et al. Intrastratial Chromospheres' Transplant Reduces Nociception in Hemiparkinsonian Rats. **Neuroscience**, v. 387, p. 123–134, 1 set. 2018.

GRACE, P. M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature reviews. Immunology**, v. 14, n. 4, p. 217–31, abr. 2014.

GRAYBIEL, A. et al. The basal ganglia and adaptive motor control. **Science**, v. 265, n. 5180, p. 1826–1831, 23 set. 1994.

GUERRERO, A. T. G. et al. Involvement of LTB 4 in zymosan-induced joint nociception in mice: participation of neutrophils and PGE 2 . **Journal of Leukocyte Biology**, 2008.

HA, A. D.; JANKOVIC, J. Pain in Parkinson's disease. **Movement Disorders**, 2012.

HAGBERG, L. et al. Cerebrospinal fluid neopterin: an informative biomarker of central nervous system immune activation in HIV-1 infection. **AIDS research and therapy**, v. 7, p. 15, jan. 2010.

HEUER, A. et al. Unilateral nigrostriatal 6-hydroxydopamine lesions in mice I: Motor impairments identify extent of dopamine depletion at three different lesion sites. **Behavioural Brain Research**, v. 228, n. 1, p. 30–43, 1 mar. 2012.

ICHINOSE, H. et al. GTP cyclohydrolase regulation: implications for brain development and function. **Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)**, v. 68, p. 23–35, jan. 2013.

ISMAIL, N. et al. Antinociceptive Effect of 3-(2,3-Dimethoxyphenyl)-1-(5-methylfuran-2-yl)prop-2-en-1-one in Mice Models of Induced Nociception. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1077, 22 ago. 2016.

JEZIORSKA, M. et al. Small Fibre Neuropathy in Parkinson's Disease: Comparison of Skin Biopsies from the More Affected and Less Affected Sides. **Journal of Parkinson's Disease**, p. 1–5, 29 jul. 2019.

JOHNSON, M. E. et al. Triggers, Facilitators, and Aggravators: Redefining Parkinson's Disease Pathogenesis. **Trends in Neurosciences**, v. 42, n. 1, p. 4–13, jan. 2019.

JULIUS, D. TRP Channels and Pain. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 2013.

KANNARKAT, G. T.; BOSS, J. M.; TANSEY, M. G. The role of innate and adaptive immunity in parkinson's disease. **Journal of Parkinson's Disease**, 2013.

KAUFMAN, S. The structure of the phenylalanine-hydroxylation cofactor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 50, p. 1085–93, dez. 1963.

KAYSER, V.; CHRISTENSEN, D. Antinociceptive effect of systemic gabapentin in mononeuropathic rats, depends on stimulus characteristics and level of test integration. **Pain**, 2000.

KHOO, T. K. et al. The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. **Neurology**, v. 80, n. 3, p. 276–281, 15 jan. 2013.

KOBAYASHI, E. H. et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. **Nature Communications**, 2016.

KRUSTEV, E.; RIOUX, D.; MCDUGALL, J. J. Mechanisms and Mediators That Drive Arthritis Pain. **Current Osteoporosis Reports**, 2015. .

LANGSTON, J. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979–980, 25 fev. 1983.

LANGSTON, J. W. The MPTP Story. **Journal of Parkinson's disease**, v. 7, n. s1, p. S11–S19, 2017.

LATREMOLIERE, A. et al. Reduction of Neuropathic and Inflammatory Pain through Inhibition of the Tetrahydrobiopterin Pathway. **Neuron**, v. 86, n. 6, p. 1393–1406, 2015.

LEE, M. A. et al. A Survey of Pain in Idiopathic Parkinson's Disease. **Journal of Pain and Symptom Management**, 2006.

LEVITE, M. Dopamine and T cells: Dopamine receptors and potent effects on T cells, dopamine production in T cells, and abnormalities in the dopaminergic system in T cells in autoimmune, neurological and psychiatric diseases. **Acta Physiologica**, 2016.

LIN, C.-H. et al. Preceding pain symptoms and Parkinson's disease: a

nationwide population-based cohort study. **European Journal of Neurology**, v. 20, n. 10, p. 1398–1404, out. 2013.

LOFRUMENTO, D. D. et al. MPTP-induced neuroinflammation increases the expression of pro-inflammatory cytokines and their receptors in mouse brain. **NeuroImmunoModulation**, 2010.

LOTHARIUS, J.; BRUNDIN, P. Pathogenesis of Parkinson's disease: dopamine, vesicles and alpha-synuclein. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 3, n. 12, p. 932–42, dez. 2002.

LOTZ, M.; CARSON, D. A.; VAUGHAN, J. H. Substance P activation of rheumatoid synoviocytes: Neural pathway in pathogenesis of arthritis. **Science**, 1987.

LUCHTING, B. et al. Anti-inflammatory T-cell shift in neuropathic pain. **Journal of Neuroinflammation**, 2015.

MADDEN, M. B.; HALL, D. A. Shoulder pain in Parkinson's disease: A case-control study. **Movement Disorders**, v. 25, n. 8, p. 1105–1106, 15 jun. 2010.

MARTINEZ, J. A. et al. Comparison of central versus peripheral delivery of pregabalin in neuropathic pain states. **Molecular pain**, v. 8, p. 3, 11 jan. 2012.

MATSUURA, K. et al. Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion. **Journal of neuroscience methods**, v. 73, n. 1, p. 45–8, 25 abr. 1997.

MENZA, M. et al. The Role of Inflammatory Cytokines in Cognition and Other Non-Motor Symptoms of Parkinson's Disease. **Psychosomatics**, v. 51, n. 6, p. 474–479, 1 nov. 2010.

MIYAMOTO, T. et al. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.

MOGIL, J. S. Animal models of pain: progress and challenges. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 4, p. 283–294, 4 abr. 2009.

MUSTAFA, G. et al. Brain targeting by intranasal drug delivery (INDD): a combined effect of trans-neural and para-neuronal pathway. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p. 923–929, 23 mar. 2016.

MYLIUS, V. et al. Pain sensitivity and descending inhibition of pain in Parkinson's disease. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 80, n. 1, p. 24–28, 1 jan. 2009.

NÈGRE-PAGÈS, L. et al. Chronic pain in Parkinson's disease: The cross-sectional French DoPaMiP survey. **Movement Disorders**, 2008.

NOLANO, M. et al. Loss of cutaneous large and small fibers in naive and l-dopa-treated PD patients. **Neurology**, v. 89, n. 8, p. 776–784, 22 ago. 2017.

PALAZZO, E. et al. Interaction between vanilloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception. **European Journal of Pharmacology**, 2002.

PARK, J. et al. Pain perception in acute model mice of Parkinson's disease induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Molecular pain**, v. 11, p. 28, 2015.

PASQUALI, L.; CALDARAZZO-IENCO, E.; FORNAI, F. MPTP neurotoxicity: Actions, mechanisms, and animal modeling of parkinson's disease. In: **Handbook of Neurotoxicity**, p. 237-75, 29 abr. 2014.

PERKINS, N. M.; TRACEY, D. J. Hyperalgesia due to nerve injury: Role of neutrophils. **Neuroscience**, 2000.

PERTOVAARA, A. et al. Striatal dopamine D2/D3 receptor availability correlates with individual response characteristics to pain. **European Journal of Neuroscience**, v. 20, n. 6, p. 1587–92, set. 2004.

PETROSKE, E. et al. Mouse model of Parkinsonism: A comparison between

subacute MPTP and chronic MPTP/probenecid treatment. **Neuroscience**, v. 106, n. 3, p. 589–601, 2001.

PFEIFFER, R. F. Non-motor symptoms in Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, 2016.

PINTO, L. G. et al. Non-Peptidergic Nociceptive Neurons Are Essential for Mechanical Inflammatory Hypersensitivity in Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 8, p. 5715–5728, 23 ago. 2019.

PISANU, A. et al. Dynamic changes in pro-and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- $\gamma$  agonist neuroprotective treatment in the MPTPp mouse model of progressive Parkinson's disease. **Neurobiology of Disease**, 2014.

PODGORNY, P. J. et al. Evidence for small fiber neuropathy in early Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 28, p. 94–9, 1 jul. 2016.

POLITIS, M. et al. Parkinson's disease symptoms: The patient's perspective. **Movement Disorders**, v. 25, n. 11, p. 1646–1651, 15 ago. 2010.

PONT-SUNYER, C. et al. The onset of nonmotor symptoms in parkinson's disease. **Movement Disorders**, 2015.

PREDIGER, R. et al. The Intranasal Administration of 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP): A New Rodent Model to Test Palliative and Neuroprotective Agents for Parkinson's disease. **Current Pharmaceutical Design**, 2011.

PREDIGER, R. D. S. et al. The risk is in the air: Intranasal administration of MPTP to rats reproducing clinical features of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 202, n. 2, p. 391–403, 2006.

PREDIGER, R. D. S. 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. **Neurotoxicity research**, v. 17, n. 2, p. 114–29, fev. 2010.

PRINGSHEIM, T. et al. The Prevalence of Parkinson's Disease. A Systematic Review pringsheim. **Movement Disorders**, 2014.

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. **Journal of neurochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1265–74, mar. 2001.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 18, n. 4, p. 251–259, 1 abr. 2017.

RANSOM, B. R. et al. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP<sup>+</sup>. **Neuroscience Letters**, v. 75, n. 3, p. 323–8, 10 abr. 1987.

REALE, M.; GREIG, N. H.; KAMAL, M. A. Peripheral chemo-cytokine profiles in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 9, n. 10, p. 1229–41, set. 2009.

REICHLING, D. B.; LEVINE, J. D. Pain and death: Neurodegenerative disease mechanisms in the nociceptor. **Annals of Neurology**, 2011.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature medicine**, v. 16, n. 11, p. 1267–76, nov. 2010.

RITTNER, H. L.; BRACK, A. Leukocytes as mediators of pain and analgesia. **Current rheumatology reports**, v. 9, n. 6, p. 503–10, dez. 2007.

RODRÍGUEZ-LEYVA, I. et al.  $\alpha$ -Synuclein inclusions in the skin of Parkinson's disease and parkinsonism. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 1, n. 7, p. 471–478, jul. 2014.

RODRIGUEZ-OROZ, M. C. et al. Initial clinical manifestations of Parkinson's disease: features and pathophysiological mechanisms. **The Lancet. Neurology**, v. 8,

n. 12, p. 1128–39, dez. 2009.

ROUSSELET, E. et al. Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. **Neurobiology of Disease**, 2003.

SAKURADA, T. et al. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 2003.

SAMPAIO, T. et al. The Relevance of Intranasal Route in Parkinson's Disease: from Physiopathological Alterations to Administration of Neurotoxins. **Clinical Pharmacology and Translational Medicine**. v.1, n. 2, p. 20 - 37, 2017.

SANTOS-GARCÍA, D. et al. Pain in Parkinson's disease: prevalence, characteristics, associated factors, and relation with other non motor symptoms, quality of life, autonomy, and caregiver burden. **Revista de neurologia**, v. 52, n. 7, p. 385–93, 1 abr. 2011.

SANTOS, R. M. S. Doença de Parkinson: há associação entre dor e resposta imunológica, 2017.

SCALZO, P. et al. Serum levels of interleukin-6 are elevated in patients with Parkinson's disease and correlate with physical performance. **Neuroscience Letters**, v. 468, n. 1, p. 56–58, 1 jan. 2010.

SCHESTATSKY, P. et al. Neurophysiologic study of central pain in patients with Parkinson disease. **Neurology**, 2007.

SCHRAG, A. et al. Prediagnostic presentations of Parkinson's disease in primary care: a case-control study. **The Lancet Neurology**, v. 14, n. 1, p. 57–64, jan. 2015.

SCHUH, C. D. et al. Prostacyclin mediates neuropathic pain through interleukin 1 $\beta$ -expressing resident macrophages. **Pain**, v. 155, n. 3, p. 545–555, mar. 2014.

SHEN, R.-S. et al. Serotonergic conversion of MPTP and dopaminergic accumulation of MPP<sup>+</sup>. **FEBS Letters**, v. 189, n. 2, p. 225–230, 23 set. 1985.

SILVA, A. L. O. da. Premotor enteric nervous system impairment in an experimental Parkinson model, 2015.

SILVERDALE, M. A. et al. A detailed clinical study of pain in 1957 participants with early/moderate Parkinson's disease. **Parkinsonism & related disorders**, v. 0, n. 0, 6 jun. 2018.

SKOGAR, O. et al. Parkinson's disease patients' subjective descriptions of characteristics of chronic pain, sleeping patterns and health-related quality of life. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 8, p. 435, out. 2012.

SKORVANEK, M. et al. Relationship between the MDS-UPDRS and Quality of Life: A large multicenter study of 3206 patients. **Parkinsonism and Related Disorders**, 2018.

SNIDER, S. R. et al. Primary sensory symptoms in parkinsonism. **Neurology**, v. 26, n. 5, p. 423–423, 1 maio 1976.

SPILLANTINI, M. G. et al.  $\alpha$ -Synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839–840, 28 ago. 1997.

STEFANIS, L.  $\alpha$ -Synuclein in Parkinson's disease. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 2, p. a009399, fev. 2012.

STEMKOWSKI, P. L. et al. Increased excitability of medium-sized dorsal root ganglion neurons by prolonged interleukin-1 $\beta$  exposure is K<sup>+</sup> channel dependent and reversible. **The Journal of Physiology**, v. 593, n. 16, p. 3739–3755, 15 ago. 2015.

STEMKOWSKI, P. L.; SMITH, P. A. Long-term IL-1 $\beta$  exposure causes

subpopulation-dependent alterations in rat dorsal root ganglion neuron excitability. **Journal of Neurophysiology**, v. 107, n. 6, p. 1586–1597, 15 mar. 2012.

SUGAMA, S. et al. Age-related microglial activation in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced dopaminergic neurodegeneration in C57BL/6 mice. **Brain research**, v. 964, n. 2, p. 288–94, 28 fev. 2003.

SUMIKURA, H. et al. Distribution of  $\alpha$ -synuclein in the spinal cord and dorsal root ganglia in an autopsy cohort of elderly persons. **Acta neuropathologica communications**, 2015.

SUNG, S. et al. Pain sensitivity in Parkinson's disease: Systematic review and meta-analysis. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 48, p. 17–27, 1 mar. 2018.

SURMEIER, D. J. et al. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Neuroscience**, 2011. .

TAGUCHI, T. et al. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model. **PAIN**, v. 156, n. 3, p. 415–427, mar. 2015.

TAKEDA, M. et al. Enhanced excitability of nociceptive trigeminal ganglion neurons by satellite glial cytokine following peripheral inflammation. **Pain**, v. 129, n. 1–2, p. 155–166, 1 maio 2007.

TANSEY, M. G.; MCCOY, M. K.; FRANK-CANNON, T. C. Neuroinflammatory mechanisms in Parkinson's disease: Potential environmental triggers, pathways, and targets for early therapeutic intervention. **Experimental Neurology**, v. 208, n. 1, p. 1–25, nov. 2007.

TANSEY, M. G.; ROMERO-RAMOS, M. Immune system responses in Parkinson's disease: Early and dynamic. **European Journal of Neuroscience**, 2019.

TEGEDER, I. et al. GTP cyclohydrolase and tetrahydrobiopterin regulate pain sensitivity and persistence. **Nature medicine**, v. 12, n. 11, p. 1269–77, 2006.

THOMAS TAYRA, J. et al. The neuroprotective and neurorescue effects of carbamylated erythropoietin Fc fusion protein (CEPO-Fc) in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Research**, v. 1502, p. 55–70, 28 mar. 2013.

TINAZZI, M. et al. Muscular pain in Parkinson's disease and nociceptive processing assessed with CO<sub>2</sub> laser-evoked potentials. **Movement Disorders**, v. 25, n. 2, p. 213–220, 30 jan. 2010.

TITA, B. et al. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 341–3, [s.d.]

TREVISAN, G. et al. TRPA1 mediates trigeminal neuropathic pain in mice downstream of monocytes/macrophages and oxidative stress. **Brain**, v. 139, n. 5, p. 1361–1377, maio 2016.

TRUINI, A.; FRONTONI, M.; CRUCCU, G. Parkinson's disease related pain: a review of recent findings. **Journal of neurology**, v. 260, n. 1, p. 330–4, jan. 2013.

UGRUMOV, M. V. et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice. **Neuroscience**, v. 181, p. 175–188, maio 2011.

USOSKIN, D. et al. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. **Nature Neuroscience**, 2015.

VALEK, L.; AUBURGER, G.; TEGEDER, I. Sensory neuropathy and nociception in rodent models of Parkinson's disease. 2019.

VIVACQUA, G. et al. Loss of spinal motor neurons and alteration of alpha-synuclein immunostaining in MPTP induced Parkinsonism in mice. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 44, n. 2, p. 76–85, jul. 2012.

WANG, C. T. et al. Attenuation of hyperalgesia responses via the modulation of 5-hydroxytryptamine signalings in the rostral ventromedial medulla and spinal cord in

a 6-hydroxydopamine-induced rat model of Parkinson's disease. **Molecular Pain**, v. 13, p. 1–13, 2017.

WANG, N. et al.  $\alpha$ -Synuclein in cutaneous autonomic nerves. **Neurology**, 2013.

WASNER, G.; DEUSCHL, G. Pains in Parkinson disease—many syndromes under one umbrella. **Nature Reviews Neurology**, v. 8, n. 5, p. 284–294, 17 maio 2012.

WERNER, E. R.; BLAU, N.; THÖNY, B. Tetrahydrobiopterin: Biochemistry and Pathophysiology. **Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. 397–414, 15 set. 2011.

WOFFORD, K.; LOANE, D.; CULLEN, Dk. Acute drivers of neuroinflammation in traumatic brain injury. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 9, p. 1481, set. 2019.

YASUDA, T.; NAKATA, Y.; MOCHIZUKI, H.  $\alpha$ -Synuclein and neuronal cell death. **Molecular neurobiology**, v. 47, n. 2, p. 466–83, abr. 2013.

YOUSUF, M. S. et al. Sensory Neurons of the Dorsal Root Ganglia Become Hyperexcitable in a T-Cell-Mediated MOG-EAE Model of Multiple Sclerosis. **eNeuro**, v. 6, n. 2, p. 24, 1 mar. 2019.

ZHANG, M. Two-step production of monoamines in monoenzymatic cells in the spinal cord: a different control strategy of neurotransmitter supply? **Neural Regeneration Research**, v. 11, n. 12, p. 1904, dez. 2016.

ZHUANG, X. et al. Contribution of Pro-inflammatory Cytokine Signaling within Midbrain Periaqueductal Gray to Pain Sensitivity in Parkinson's Disease via GABAergic Pathway. **Frontiers in Neurology**, v. 7, p. 104, 25 jul. 2016.