



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

Samantha Cristiane Lopes

**Administração intranasal do fator neurotrófico de dopamina cerebral (*CDNF*) como
estratégia terapêutica na doença de Parkinson**

Florianópolis
2019

Samantha Cristiane Lopes

Administração intranasal do fator neurotrófico de dopamina cerebral (*CDNF*) como estratégia terapêutica na doença de Parkinson

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. Rui Daniel Prediger, Dr.
Coorientador: Prof. Aderbal Silva Aguiar Júnior, Dr.

Florianópolis

2019

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

Lopes, Samantha Cristiane
Administração intranasal do fator neurotrófico de
dopamina cerebral (CDNF) como estratégia terapêutica na
doença de Parkinson / Samantha Cristiane Lopes ;
orientador, Rui Daniel Schröder Prediger, coorientador,
Aderbal Silva Aguiar Júnior, 2019.
209 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. Fatores
neurotróficos. 4. CDFN. 5. Intranasal. I. Prediger, Rui
Daniel Schröder. II. Aguiar Júnior, Aderbal Silva . III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Samantha Cristiane Lopes

**Administração intranasal do fator neurotrófico de dopamina cerebral (*CDNF*)
como estratégia terapêutica na doença de Parkinson**

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

Profª. Elaine Aparecida Del-Bel Belluz Guimarães, Dra.

Universidade de São Paulo

Profª. Alexandra Susana Latini, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

Eduardo Souza Silva, Dr.

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. Rui Daniel Schröder Prediger, Dr.

Coordenador do Programa

Prof. Rui Daniel Schröder Prediger, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2019.

Este trabalho é dedicado à minha família e aos amigos que se tornaram família, sempre (presentes em minha vida) contribuindo para que eu seja uma pessoa melhor a cada dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

“É Ele o autor da fê, do princípio ao fim”.

A minha família.

Meus pais, Pedro e Rose

Nunca vi amor maior e sei que nunca verei.

Obrigada pelo amor incondicional e as vezes até mesmo irracional!

Obrigada por serem tudo para mim e meus irmãos e nos fazerem acreditar que, se:

“Eu quero, eu posso e eu consigo” (Mãe, Rose).

Meus irmãos, Sula e William

Não conheço ninguém com o coração de vocês,

espero um dia ser metade do que vocês são.

Obrigada por sempre cuidarem de mim!

E aos amores da vida de meus irmãos, que também se tornaram da minha vida,

Djony, Djúlia, Theodoro e Bella Myah!

Meus irmãos não poderiam ter encontrado pessoas melhores e

que me dessem os sobrinhos mais cheios de luz de todo o mundo.

Obrigada por ajudarem a realizar o desejo de meus pais de termos uma família unida!

Por vocês dou minha vida, pois sem vocês não seria ninguém.

Aos amigos da vida.

Amábily, Ana Cláudia, Ana Jesse, Andreia, Angela, Bruna, Deise, Franci Ellen, Gabriela, Gislaine, Katiane, Keila, Lucas, Marijú, Marina, Nathalia, Paulo e Raiany.

Vocês foram essenciais para que eu vivesse feliz durante minha morada

“longe de casa”, sempre terei um pouquinho de cada um de vocês em mim.

Obrigada por todos os sentimentos compartilhados, pelo companheirismo e amizade!

Aos meus grandes mestres.

Professor Dr. Rui Prediger

Obrigada por abrir as portas do seu laboratório para mim há 10 anos atrás!

Pela oportunidade que me concedeu de seguir fazendo o que gosto e por todo o apoio e aprendizado durante esses anos.

Professor Dr. Aderbal Aguiar

Você foi essencial desde o início da minha carreira científica, obrigada por aceitar ser meu coorientar agora e sempre!

Professor Dr. Mark William Lopes

És meu exemplo diário e constante de profissional, de ser humano, de vida.

Jamais terei palavras suficientes para expressar toda a minha admiração e gratidão!

Dr. Paulo Alexandre de Oliveira

Sou grata por ter me promovido do cargo de colega à amiga.

Obrigada onde quer que estejas, estar sempre ao meu lado, pronto para compartilhar teu conhecimento e sede de aprender todos os dias!

Aos colegas de uma década de LEXDON

Aderbal, Ana Cristina, Ana Elisa, Ana Jesse, Anderson, Andreia, Angela, Bruna, Cibele, Cinthia, Dayse, Diana, Fernanda Barros, Fernanda Mesquita, Filipe, Flora, Gislaine, Glauce, Isabella, Jofre, Josiel, Jozimar, Juliana Ben, Juliana de Moura, Katiane, Keila, Marcela, Marcelo, Marina, Marissa, Naiani, Nei, Nelson, Paulo, Sandro, Stella, Tuane e Tuany.

Compartilhamos da mesma paixão, a paixão pela ciência.

Foi uma honra enorme a convivência com cada um de vocês.

Obrigada por todo o apoio e aprendizado compartilhado!

Aos colaboradores deste trabalho

Professor Dr. Alfeu Zanotto Filho

Professora Dr.^a Ana Lúcia Rodrigues

Professora Dr.^a Cláudia Figueiredo

Professora Dr.^a Debora Foguel

Professora Dr.^a Elaine Del-Bel

Colegas e colaboradores:

Anderson, Angela, Bruna, Cibele, Glauce, Diana, Katiane, Keila, Marina, Naiani,
Marcelo, Mark e Paulo

Vocês tornaram este trabalho possível,

muito obrigada por todo o companheirismo e profissionalismo durante a jornada!

Ao CNPq, CAPES, FAPESC e ao Departamento de Farmacologia/UFSC
pelo suporte financeiro e Institucional.

"Above all, don't fear difficult moments. The best comes from them."

Rita Levi-Montalcini

(1909 - 2012)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) caracteriza-se pela degeneração progressiva de neurônios da substância negra (SN) e o surgimento de sintomas motores clássicos oriundos da redução nos conteúdos de dopamina no estriado. Os tratamentos atualmente disponíveis para a DP são satisfatórios para o manejo sintomático; contudo, importantes efeitos adversos tendem a surgir com a cronicidade do tratamento e a eficácia tende a diminuir à medida que a perda neuronal progride. De maneira que o grande desafio da DP, refere-se ao desenvolvimento de uma terapia capaz de retardar ou interromper a progressão da doença. Fatores neurotróficos (NTFs) são proteínas endógenas conhecidas por promover a manutenção e sobrevivência de neurônios, protegendo-os de toxinas e lesões. Devido às suas propriedades neuroprotetoras e neurorestauradoras, a capacidade terapêutica dos NTFs tem sido testada em várias doenças neurodegenerativas. No âmbito da DP, o potencial de dois principais NTFs, o fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF) e a neurturina (NRTN), vem sendo amplamente explorado. E, muito embora exista uma enormidade de resultados favoráveis *in vitro* e em modelos *in vivo* da doença, ensaios clínicos usando tais NTFs não têm demonstrado um benefício terapêutico claro. Baseando-se no cenário experimental, é possível identificar uma série de possíveis explicações para a falta de sucesso da translação ao cenário clínico; dentre as quais, enfatiza-se: a biodisponibilidade do agente trófico no tecido alvo como um dos grandes desafios no status de desenvolvimento das terapias baseadas em NTFs. Recentemente, uma diferente proteína pôde ser adicionada à lista dos NTFs em ensaios clínicos na DP: o fator neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF). O CDFN é um dos integrantes de uma família de NTFs não convencionais, que são estruturalmente e mecanisticamente distintos de outros NTFs. Desde sua descoberta, o CDFN tem renovado as expectativas a respeito das terapias baseadas em NTFs para a DP, ainda que seu efeito sobre o estágio avançado da doença permaneça controverso. Assim, o intuito principal do presente trabalho foi avaliar o possível efeito neurorestaurador do CDFN quando administrado pela via intranasal (i.n.) em um modelo animal que reflete o estágio avançado da DP e sua associação com a terapia padrão-ouro atual. Para isso, um extenso estudo comportamental foi realizado a fim de avaliar a função motora e não motora dos animais; anterior à análise dos níveis cerebrais do CDFN e do nível de lesão dopaminérgica induzida pela 6-OHDA. O CDFN i.n. foi capaz de atenuar e/ou reverter a disfunção motora quando avaliado no teste do rotarod, teste do cilindro, testes de equilíbrio em barra horizontal, teste do adesivo, teste do campo aberto, teste de descida em barra vertical, teste da caminhada em escada horizontal e teste da pegada. Além de demonstrar efeitos positivos sobre a memória avaliada através teste do labirinto em Y e do comportamento anedônico avaliado no teste de borrifada com sacarose em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA. A administração do CDFN i.n. demonstrou ser uma abordagem segura, segundo os indicadores de peso corporal dos animais e índice de sobrevivência. O CDFN i.n. reduziu significativamente a neurodegeneração dopaminérgica na SN de animais lesionados com a 6-OHDA, observada 8 meses após a administração do NTF por via i.n. Além disso, a administração i.n. crônica do CDFN associado ao tratamento padrão com a L-DOPA, demonstrou um potencial sinérgico sobre danos da função motora induzidos pela lesão com a 6-OHDA. Por fim, foi demonstrado que os níveis do CDFN no estriado de animais idosos encontra-se reduzido, enquanto a lesão dopaminérgica parece inerte às concentrações do NTF à nível estriatal. Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a estratégia de utilização da via i.n., confere à terapia baseada no uso de NTFs, um meio eficaz e não invasivo para a entrega do suprimento trófico. Em especial, a conjuntura à qual foi testado o CDFN por via i.n. torna ainda mais relevante os efeitos observados com o método de entrega do NTF. Seu potencial em reverter prejuízos motores, cognitivos, de emocionalidade e a possibilidade de

associação com a L-DOPA em um modelo que se relaciona às fases avançadas da DP, difere das estratégias até então utilizadas na pesquisa com o CDNF. Todos esses aspectos somados tornam o trabalho singular e repleto de perspectivas positivas para o campo de NTFs na DP.

Palavras-chave: Doença de Parkinson. Neurorestauração. Fatores neurotróficos. CDNF. Intranasal.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is characterized by the progressive degeneration of substantia nigra's neurons (SN) and the onset of classic motor symptoms due to the reduction in striatal dopamine content. The current treatments are satisfactory for symptomatic management; however, significant adverse effects tend to appear with the treatment chronicity, and efficacy tends to diminish as neuronal loss progresses. Thus, the great challenge of PD refers to the development of a therapy capable of interfering the progression of the disease. Neurotrophic factors (NTFs) are endogenous proteins known to promote the maintenance and survival of neurons, protecting them against toxins and injuries. The therapeutic capacity of NTFs has been tested in several neurodegenerative diseases due to their neuroprotective and neurorestorative properties. Two main NTFs have been extensively explored in the PD, glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and neurturin (NRTN). Moreover, even though there are countless favorable results *in vitro* and *in vivo* models of the disease, clinical trials using such NTFs have not shown a clear therapeutic benefit. It is possible to identify many explanations for the lack of success in translation to the clinic based on the experimental context, among which, the bioavailability of the trophic agent in the target tissue as one of the major challenges in the developmental status of NTF-based therapies. Recently, a different protein had been added to the list of NTFs in PD clinical trials: the cerebral dopamine neurotrophic factor (CDNF). CDNF is a member of an unconventional NTFs family, structurally and mechanistically distinct from other NTFs. Since its discovery, CDNF has renewed expectations about NTF-based therapies for PD, although its effect on the advanced stage of the disease remains controversial. Thereby, the main purpose of the present study was to evaluate the possible neurorestorative effect of CDNF when administered intranasally (i.n.) in an animal model that reflects the advanced stage of PD and its association with current gold-standard therapy. For this, an extensive behavioral study was performed to evaluate the motor and nonmotor function of the animals; preceded by analysis of CDNF brain's levels and 6-OHDA-induced dopaminergic lesion level. CDNF i.n. was able to attenuate and/or reverse motor dysfunction when assessed in rotarod test, cylinder test, beam balance test, adhesive test, open field test, pole test, ladder rung walking test and footprint test. Moreover, the treatment presented positive effects on memory, evaluated in the Y-maze test, and on anhedonic behavior, evaluated in the splash test, in unilaterally injured animals with 6-OHDA. I.n. CDNF administration proved to be a safe approach, according to the indicators of animal body weight and survival rate. CDNF i.n. significantly reduced dopaminergic neurodegeneration in SN from 6-OHDA-injured animals observed 8 months after i.n. In addition, the i.n. CDNF associated with standard treatment, L-DOPA, demonstrated a synergistic potential over motor function induced by injury with 6-OHDA. Finally, striatal CDNF levels in aged animals have been shown to be reduced, while dopaminergic injury appears inert to striatal NTF concentrations. Taken together, these results suggest that the strategy of using the i.n. pathway gives NTFs-based therapy an effective and non-invasive means for trophic supply delivery. In particular, the conjecture at which i.n. CDNF was tested makes even more relevant the effects observed with the NTF delivery method. Its potential to reverse motor, cognitive, emotional impairments and the possibility of association with L-DOPA in a model that mimics the advanced stages of PD differs from previously strategies used in researches with CDNF. All these aspects, taken together, make the study unique and full of positive perspectives for the field of NTFs in PD.

Keywords: Parkinson's disease. Neurorestoration. Neurotrophic factors. CDNF. Intranasal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos principais eventos fisiopatológicos envolvidos na DP e as estratégias de tratamento paliativas versus as estratégias modificadoras do curso da doença com o uso de NTFs.....	44
Figura 2: Representação esquemática dos principais mecanismos celulares envolvidos com a propagação da α -sinucleína na fisiopatologia da DP.....	48
Figura 3: Quadro de sintomas clínicos associados à progressão da DP.....	50
Figura 4: Gráfico esquemático que demonstra o padrão de resposta motora frente ao tratamento com a L-DOPA durante a progressão da DP.....	52
Figura 5: Representação esquemática da primeira evidência experimental que subsidiou a teoria acerca da existência de NTFs.....	55
Figura 6: Diagrama com a classificação dos NTFs de acordo com sua estrutura e função.	57
Figura 7: Estrutura dos NTFs utilizados em ensaios clínicos em pacientes com a DP.	73
Figura 8: Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos com o mecanismo de ação do CDNF.....	76
Figura 9: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação do efeito neurorestaurador da administração intranasal do CDNF.....	89
Figura 10: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação dos efeitos da administração intranasal crônica do CDNF.....	90
Figura 11: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação dos efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA associada ao CDNF i.n.....	91
Figura 12: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação dos níveis de fatores neurotróficos no envelhecimento e na doença de Parkinson.	92
Figura 13: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre parâmetros de coordenação motora e equilíbrio em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	112
Figura 14: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o parâmetro de assimetria motora em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	114
Figura 15: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o parâmetro de equilíbrio e coordenação motora fina em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	116
Figura 16: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre parâmetros da atividade locomotora espontânea em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB....	118

Figura 17: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre parâmetros de coordenação e equilíbrio, bradicinesia e marcha em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	120
Figura 18: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a marcha em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	122
Figura 19: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a função não motora em parâmetros cognitivos e do estado ansioso em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	124
Figura 20: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a função não motora de estado hedônico em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	126
Figura 21: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o peso corporal em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	128
Figura 22: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a sobrevivência de animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	129
Figura 23: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o imunocontéudo de TH em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	131
Figura 24: Efeito da administração intranasal do CDNFrh sobre o imunocontéudo do CDNFh/CDNFr em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	133
Figura 25: Efeito da administração intranasal em dose única e doses múltiplas do CDNFrh sobre os níveis do CDNFr em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	135
Figura 26: Efeito da administração intranasal em dose única e doses múltiplas do CDNFrh sobre parâmetros de coordenação, equilíbrio e assimetria motora em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	137
Figura 27: Efeito da administração intranasal em dose única e doses múltiplas do CDNFrh sobre o nível de lesão dopaminérgica em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	139
Figura 28: Efeito da administração crônica de L-DOPA sobre a indução de discinesias, prejuízo motor e imunocontéudo de TH em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	141
Figura 29: Efeito da administração crônica de L-DOPA sobre o imunocontéudo de NTFs em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	143

Figura 30: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em animais lesionados com a 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA.....	146
Figura 31: Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n. sobre o equilíbrio, coordenação e assimetria motora de animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	148
Figura 32: Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n. sobre as LIDs e os níveis estriatais de CDNFr em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.....	150
Figura 33: Efeito do envelhecimento sobre os níveis do CDNF.....	151
Figura 34: Efeito do envelhecimento sobre os níveis do GDNF em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB.....	153
Figura 35: Efeito da lesão com a 6-OHDA no MFB sobre os níveis do CDNF.....	154
Figura 36: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em animais lesionados com a 6-OHDA e em pacientes com a DP.....	159

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sumário dos estudos clínicos com NTFs na DP.	70
Quadro 2: Estudos investigando os efeitos do CDNF em modelos experimentais da DP.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF no estriado de animais lesionados com a 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA.	145
Tabela 2: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF na substância negra de animais lesionados com a 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA.	145
Tabela 3: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB.	156
Tabela 4: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em pacientes com a DP.	158

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA: 6-hidroxidopamina

AAV: Vetor viral adenoassociado

AIMs: Movimentos involuntários anormais (do inglês: *abnormal involuntary movements*)

Akt: Proteína cinase B

ANOVA: Análise de variância

BDNF: Fator neurotrófico derivado do cérebro

BHE: Barreira hematoencefálica

CDNF: Fator neurotrófico de dopamina cerebral (do inglês: *cerebral dopaminergic neurotrophic factor*)

CDNFh: Fator neurotrófico de dopamina cerebral humano

CDNFr: Fator neurotrófico de dopamina cerebral de roedor

CDNFrh: Fator neurotrófico de dopamina cerebral recombinante humano

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COMT: Catecol-O-metiltransferase

DA: Dopamina

DAT: Transportador de dopamina

DBS: Estimulação cerebral profunda

DDC: DOPA-descarboxilase

DP: Doença de Parkinson

e.p.m: Erro padrão da média

ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

GABA: Ácido gama-aminobutírico

GDNF: Fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais

H&Y: Escala Modificada de Hoehn & Yahr

i.n.: Intranasal

i.p.: Intraperitoneal

ICV: Intracerebroventricular

LBs: Corpos de Lewy (do inglês: *Lewy bodies*)

L-DOPA: Levodopa (L-3,4-diidroxifenilalanina)

LIDs: Discinesias induzidas pela L-DOPA (do inglês: *L-DOPA-induced dyskinesia*)

MANF: Fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos

MAO-B: Monoamino oxidase B

MFB: Feixe prosencefálico medial (do inglês: *medial forebrain bundle*)

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

NGF: Fator de crescimento neural

NMDA: N-metil-D-aspartato

NRTN: Neurturina

NST: Núcleo subtalâmico

NT-3: Neurotrofina-3

NT-4: Neurotrofina-4

NTFs: Fatores neurotróficos (do inglês: *neurotrophic factors*)

PERK: Proteína cinase do retículo endoplasmático

r.p.m.: Rotações por minuto

RE: Retículo endoplasmático

s.c.: Subcutânea

SN: Substância negra

SNc: Substância negra parte compacta

SNC: Sistema nervoso central

SNP: Sistema nervoso periférico

STN HFS: Estimulação de alta frequência no núcleo subtalâmico

SUS: Sistema Único de Saúde

TH: Tirosina hidroxilase

TrkB: Receptor de tropomiosina quinase B

UPDRS: Escala Unificada de Avaliação da Doença de Parkinson

UPR: Via de resposta a proteínas mal enoveladas (do inglês: *unfolded protein response*)

UPS: Sistema ubiquitina-proteassoma (do inglês: *ubiquitin-proteasome system*)

v.o.: Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada ou protegida por direitos autorais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	41
2	REFERENCIAL TEÓRICO	45
2.1	DOENÇA DE PARKINSON.....	45
2.2	FATORES NEUROTROFICOS.....	53
2.2.1	Fatores neurotróficos na DP	58
2.2.1.1	<i>O estado da arte da história até a atualidade</i>	58
2.2.2	Fator neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF)	71
2.2.2.1	<i>Implicações mecanicistas da estrutura proteica do CDFN</i>	71
2.2.2.2	<i>RE e o mecanismo de ação do CDFN</i>	74
2.2.2.3	<i>Estudos pré-clínicos com o CDFN na DP</i>	77
2.2.3	Desafios da terapia baseada no uso de NTFs na DP	82
2.2.3.1	<i>Via de administração intranasal no contexto da DP</i>	83
3	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	84
4	OBJETIVOS	85
4.1.1	Objetivo Geral	85
4.1.2	Objetivos Específicos	85
5	METODOLOGIA	87
5.1	Animais	87
5.2	DROGAS E TRATAMENTOS	87
5.2.1	Protocolos experimentais	88
5.3	CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	93
5.4	ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL	93
5.5	AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS: EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	94
5.5.1	Testes para avaliação de parâmetros comportamentais motores	94
5.5.1.1	<i>Teste do rotarod</i>	94
5.5.1.2	<i>Teste do cilindro</i>	95

5.5.1.3	<i>Teste de equilíbrio na barra horizontal</i>	95
5.5.1.4	<i>Teste do adesivo</i>	96
5.5.1.5	<i>Teste do campo aberto</i>	96
5.5.1.6	<i>Teste de descida em barra vertical</i>	97
5.5.1.7	<i>Teste da caminhada em escada horizontal</i>	97
5.5.1.8	<i>Teste da pegada</i>	98
5.5.1.9	<i>Teste de rotação induzido pela apomorfina</i>	98
5.5.2	Testes para avaliação de parâmetros comportamentais não motores	99
5.5.2.1	<i>Teste do labirinto em Y</i>	99
5.5.2.2	<i>Teste do labirinto em cruz elevado</i>	99
5.5.2.3	<i>Teste da borrifada com sacarose</i>	100
5.5.3	Teste para avaliação das discinesias induzidas pela L-DOPA	100
5.5.3.1	<i>Avaliação de movimentos involuntários anormais</i>	100
5.5.4	Avaliação de parâmetros relacionados ao bem-estar geral dos animais	101
5.5.4.1	<i>Avaliação do peso corporal</i>	101
5.5.4.2	<i>Avaliação do índice de sobrevivência</i>	101
5.6	AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS: EXPERIMENTOS <i>EX VIVO</i>	102
5.6.1	<i>Western Blotting</i>	102
5.6.1.1	<i>Obtenção e preparo das amostras</i>	102
5.6.1.2	<i>Eletroforese e eletrotransferência</i>	102
5.6.1.3	<i>Imunodeteção de TH, CDNF e GDNF</i>	103
5.6.1.4	<i>Quantificação dos níveis de proteínas</i>	103
5.6.2	Imunohistoquímica	104
5.6.2.1	<i>Perfusão transcardíaca e coleta dos tecidos</i>	104
5.6.2.2	<i>Processamento do tecido</i>	104
5.6.2.3	<i>Imunohistoquímica para TH e CDNF</i>	104

5.6.2.4	<i>Obtenção e análise das imagens.....</i>	105
5.6.3	ELISA	105
5.6.3.1	<i>Obtenção e preparo das amostras.....</i>	106
5.6.3.2	<i>Dosagem de proteínas totais.....</i>	106
5.6.3.3	<i>Ensaio de imunoabsorção enzimática</i>	106
5.7	ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA	107
5.7.1	Seleção dos conjuntos de dados	107
5.7.1.1	<i>Conjunto de dados 1: Dados de animais discinéticos tratados cronicamente com a L-DOPA e lesionados com a 6-OHDA.....</i>	108
5.7.1.2	<i>Conjunto de dados 2: Dados de animais lesionados com a 6-OHDA em diferentes tempos pós-lesão.....</i>	108
5.7.1.3	<i>Conjunto de dados 3: Dados de pacientes com a DP em diferentes estágios segundo Braak</i>	109
5.7.2	Análise dos dados de microarranjo.....	109
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	110
6	RESULTADOS	111
6.1	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURORESTAURADOR DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DO CDNF.....	111
6.1.1	Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre parâmetros da função motora	111
6.1.1.1	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função motora, avaliados a curto, médio e longo prazo no teste do rotarod e teste do cilindro em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB.....</i>	111
6.1.1.2	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função motora, avaliados a médio prazo no teste de equilíbrio na trave horizontal, teste do adesivo e teste do campo aberto em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB.....</i>	115
6.1.1.3	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função motora, avaliados a longo prazo no teste da descida em barra vertical, teste da caminhada em escada horizontal e teste da passada em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	119

6.1.2	Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre parâmetros da função não motora	123
6.1.2.1	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função não motora, avaliados a médio prazo no teste do labirinto em Y e teste do labirinto em cruz elevado em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	123
6.1.2.2	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função não motora, avaliados a longo prazo no teste da borrifada com sacarose em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	125
6.1.3	Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre o bem-estar geral dos animais	127
6.1.3.1	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e o peso corporal, avaliado a curto, médio e longo prazo em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	127
6.1.3.2	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e a sobrevivência de ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	129
6.1.4	Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre a degeneração dopaminérgica	130
6.1.4.1	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e a marcação para TH através da técnica de imunohistoquímica no estriado e na SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	130
6.1.5	Efeitos da administração i.n. do CDNF_{rh} sobre os níveis do CDNF_h/CDNF_r	132
6.1.5.1	<i>Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e os níveis de CDNF endógeno através da técnica de imunohistoquímica no estriado e na SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	132
6.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL CRÔNICA DO CDNF	134
6.2.1	Comparação da administração i.n. em dose única do CDNF vs. doses múltiplas	134

6.2.1.1	<i>Administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNFrh (10 µg) e os níveis endógenos de CDNF (CDNFr) através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) no estriado e SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	134
6.2.1.2	<i>Administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNFrh (10 µg) e parâmetros da função motora, avaliados no teste do rotarod e teste do cilindro em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	136
6.2.1.3	<i>Administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNFrh (10 µg) e o nível de lesão dopaminérgica avaliada indiretamente pelo teste de rotação induzido pela apomorfina em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	138
6.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM A L-DOPA ASSOCIADA AO CDNF INTRANASAL	140
6.3.1	Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA sobre os níveis de NTFs	140
6.3.1.1	<i>Tratamento crônico com a L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida), parâmetros da função motora e caracterização da indução de discinesias em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	140
4.3.1.2	<i>Tratamento crônico com a L-DOPA v.o. e o imunocontéudo de NTFs (GDNF e CDNF) analisado através da técnica de Western Blotting no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	142
4.3.1.3	<i>Análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis estriatais de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) em ratos tratados com a L-DOPA (discinéticos e não discinéticos) e lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	144
6.3.2	Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n.	147
6.3.2.1	<i>Administração crônica do CDNF i.n. (10 µg) e da L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) e parâmetros da função motora, avaliados no teste do rotarod, teste do cilindro e teste de rotação com apomorfina em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB</i>	147
6.3.2.2	<i>Administração i.n. crônica do CDNF (10 µg) e as LIDs em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	149
6.3.2.2.1	<i>Correlação entre os níveis estriatais de CDNFr analisados por ELISA e a gravidade das LIDs em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB</i>	149

6.4	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATORES NEUROTROFICOS NO ENVELHECIMENTO E na DOENÇA DE PARKINSON	151
6.4.1	Efeito do envelhecimento sobre os níveis de NTFs	151
6.4.1.1	<i>Níveis do CDNF no estriado de animais jovens e idosos quantificados através da técnica de ELISA</i>	<i>151</i>
6.4.1.2	<i>Níveis do GDNF quantificados através da técnica de Western Blotting no estriado e na SN de animais jovens e idosos lesionados com 6-OHDA no MFB.....</i>	<i>152</i>
6.4.2	Influência da DP sobre os níveis de NTFs	154
6.4.2.1	<i>Níveis do CDNF no estriado de animais naive e lesionados com 6-OHDA no MFB através da técnica de ELISA.....</i>	<i>154</i>
6.4.2.2	<i>Análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis estriatais de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) em ratos eutanasiados em distintos tempos após lesão com 6-OHDA no MFB.....</i>	<i>155</i>
6.4.2.3	<i>Análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) na SN de pacientes com a DP classificada como leve, moderada e grave segundo o estadiamento de Braak.....</i>	<i>157</i>
7	DISCUSSÃO.....	160
8	CONCLUSÕES.....	190
	REFERÊNCIAS	191
	APÊNDICE I	208
	APÊNDICE II.....	209

1 INTRODUÇÃO

A proporção mundial de pessoas com idade superior a 60 anos está crescendo mais rapidamente do que qualquer outro grupo etário, sendo este o resultado de uma maior expectativa de vida e redução nas taxas de natalidade (WHO, 2015). Enquanto na década de 1950 os gráficos de distribuição da população por faixa etária eram representados por uma pirâmide, com baixa proporção de idosos, o prognóstico para 2060 é que vejamos praticamente a forma de um retângulo esboçando tais estatísticas, com equivalência entre a parcela da população jovem e idosa. Dentre os brasileiros, a população com 60 anos ou mais, que atualmente já ultrapassa os 25,9 milhões de indivíduos, deverá atingir cerca de 73,5 milhões em 2060, representando aproximadamente 33,7% de toda a população e um incremento médio de mais de 1,0 milhão de idosos anualmente (IBGE, 2017).

Assim, embora o aumento na expectativa de vida possa ser visto como uma história de sucesso das políticas de saúde pública e do desenvolvimento socioeconômico e científico, também representa um desafio à sociedade moderna a fim de maximizar a condição de saúde destes indivíduos e minimizar a progressão dos reconhecidos “males da idade”. Dentre as doenças neurodegenerativas associadas ao avanço da idade, destacam-se a doença de Alzheimer (DA) e a doença de Parkinson (DP) (COLLIER; KANAAN; KORDOWER, 2011).

A DP afeta 1-2% da população acima dos 60 anos de vida e essa relação aumenta com o avanço da idade, chegando a cifra estonteante de cerca de 10 milhões de pessoas acometidas em todo o mundo (CUMMINGS et al., 2014; DE LAU; BRETELER, 2006). No Brasil, a notificação da DP não é compulsória, o que nos leva a números subestimados de sua prevalência. Presume-se que haja cerca de 220 mil pacientes parkinsonianos no país e ainda baseado em coortes internacionais sugere-se que este número mais que dobrará até 2030. No entanto, neste levantamento de dados, a estimativa foi embasada em índices de países vizinhos latino-americanos (DORSEY et al., 2007). Se levarmos em consideração uma pesquisa realizada em uma cidade do interior de Minas Gerais, onde o número de parkinsonianos representava 3,3% da população acima dos 60 anos de idade (BARBOSA et al., 2006), pode-se inferir que atualmente existem mais de 850 mil indivíduos com a DP no país, segundo o último censo populacional (AIRAVAARA et al., 2011; IBGE, 2018).

A etiologia da DP envolve a interação de fatores ambientais e genéticos, sendo considerada uma doença de origem multifatorial. Assim, muito embora uma fração dos casos de pacientes diagnosticados com a DP apresente clara relação com a hereditariedade familiar,

90% dos casos são esporádicos, justificando a dificuldade em determinar o seu fator etiológico primário (CORTI; LESAGE; BRICE, 2011; GOLDMAN, 2014). Todavia, apesar da etiologia incerta, vários aspectos da sua fisiopatologia estão bem consolidados e caracterizados, sendo a DP o reflexo de uma degeneração lenta e progressiva dos neurônios dopaminérgicos na substância negra (SN), com conseqüente redução no conteúdo de dopamina (DA) no estriado e presença dos corpos de Lewy em diversas regiões do sistema nervoso (OBESO et al., 2017).

Por ser uma doença neurodegenerativa progressiva que usualmente acarreta incapacidade grave após 10 a 15 anos do diagnóstico, além do impacto social, a DP apresenta elevado encargo financeiro. Estima-se que o custo anual mundial com medicamentos antiparkinsonianos seja de 53 bilhões de dólares, sendo o tratamento cerca de 3 a 4 vezes mais caro em pacientes na fase avançada da doença (CUMMINGS et al., 2014; DODEL et al., 1998; SIDEROWF; HOLLOWAY; STERN, 2000). No Brasil, o investimento do Ministério da Saúde através da disponibilização de medicamentos antiparkinsonianos tem sido avaliado em 200 milhões de reais/ano para atender cerca de 50 mil pacientes. Custos esses que devem ser muito maiores considerando todas os gastos com terapias não-medicamentosas, como os procedimentos de neurocirurgia para estimulação cerebral (que variam individualmente de 200 a 500 mil reais) e equipe multidisciplinar de atendimento – ambos serviços de assistência previstos no Protocolo Clínico de Diretrizes Terapêuticas sobre Parkinson e no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (CONITEC, 2017; SAS/MS, 2017; VIERA, 2018). Ou seja, uma fatura na casa de uma dezena de numerais, que reflete significativamente nos cofres nacionais e atende menos de ¼ dos pacientes parkinsonianos do Brasil.

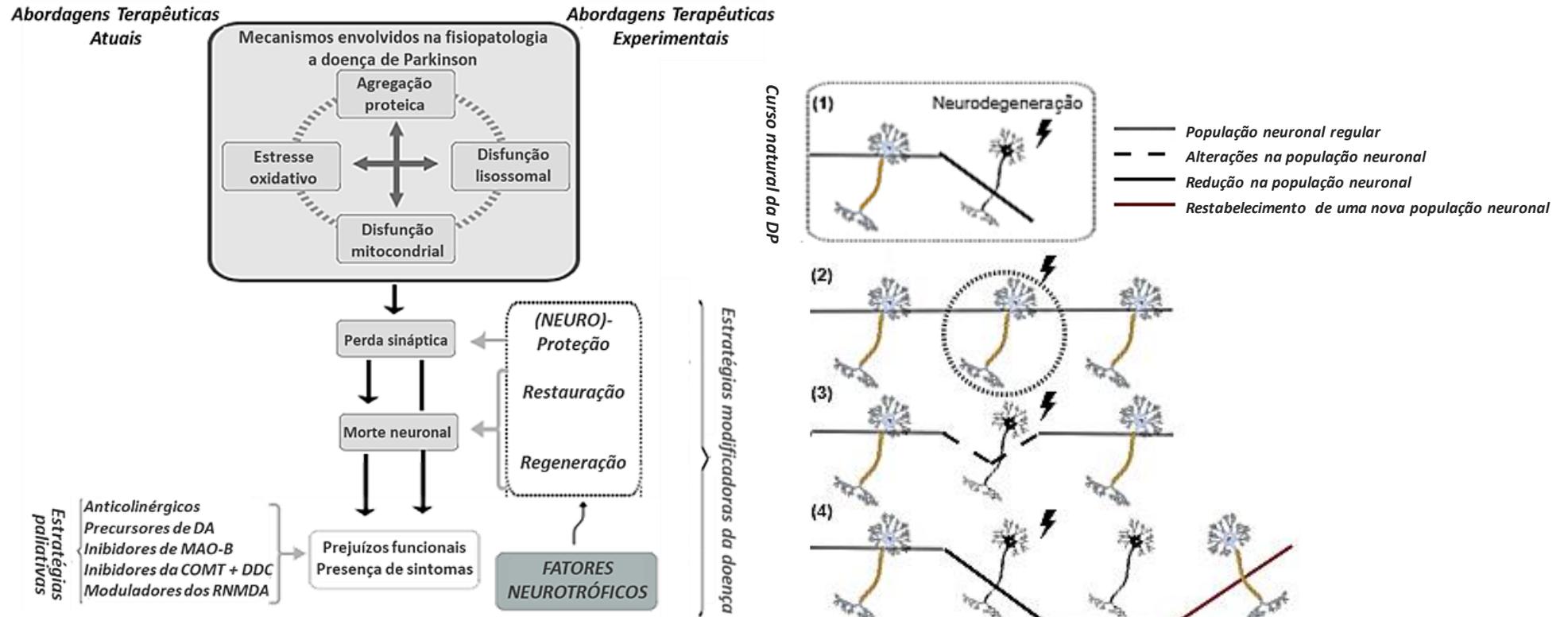
Seguramente as opções farmacoterapêuticas para a DP também cresceram consideravelmente nos últimos 25 anos, assim como o entendimento acerca de sua fisiopatologia. Mas, ainda que com o surgimento de novos fármacos, a L-DOPA permanece como o tratamento padrão-ouro para os sintomas motores cardinais da doença (tremor de repouso, bradicinesia e rigidez muscular) (KATZENSCHLAGER et al., 2003). Contudo, a baixa eficácia sobre os sintomas não motores (como a depressão, as alterações de sono e os distúrbios olfatórios e gastrointestinais), aliado às complicações associadas com a progressão da doença e a necessidade de aumento de dose da L-DOPA, limitam a sua utilização em estágios mais avançados da DP. Cerca de 90% dos pacientes tratados durante 10 anos com a L-DOPA desenvolvem efeitos adversos severos, que podem ser mais debilitantes que os próprios sintomas motores da doença (AHLISKOG; MUEENTER, 2001). Ademais, todos os medicamentos existentes atualmente para o tratamento da DP continuam sendo opções com fins

paliativos, tendo os pacientes uma expectativa de vida média de 7 a 14 anos após o diagnóstico e uma mortalidade 3 vezes maior do que a população em geral de mesma faixa etária (HELY et al., 2008; SVEINBJORNSDOTTIR, 2016). Até o momento, portanto, a DP permanece incurável, com estratégias terapêuticas paliativas (focadas no alívio dos sintomas motores) e limitadas pelo tempo e avanço da neurodegeneração. Logo, a possibilidade de atuar sobre a gravidade da doença, reduzindo a degeneração e/ou restaurando a funcionalidade dos neurônios remanescentes, traria um benefício imensurável na terapêutica da DP.

A fim de ultrapassar tais barreiras que mitigam a DP, muito se tem buscado avançar em estratégias terapêuticas modificadoras da doença que, como o título sugere, aspiram alterar o curso natural da doença. Tais estratégias incluem abordagens com capacidade moduladora sobre os mecanismos elementares da patogênese da DP, com drogas que possam atuar para proteger as células de danos, regenerar células danificadas ou permitir a formação de novos neurônios; levando à neuroproteção, neurorestauração ou neuroregeneração (LANG, A. E.; ESPAY, A. J., 2018).

Neste sentido, vem ganhando atenção a terapia com fatores neurotróficos (NTFs, do inglês *neurotrophic factors*). Dentre outras propriedades, os NTFs possuem a capacidade de proteger, restaurar e regenerar populações neuronais sob ameaça (LANG, A. E.; ESPAY, A. J., 2018). Essas características tornam os NTFs alvos na investigação terapêutica para doenças neurodegenerativas como a DP, dada sua potencialidade de intervir tanto nos sinais e sintomas, quanto no avanço da degeneração (ARON; KLEIN, 2011). Na **Figura 1** é representado um panorama geral esquematizando os principais eventos envolvidos na fisiopatologia da DP, a terapêutica atual e as potenciais estratégias terapêuticas futuras, destacando o emprego de NTFs.

Figura 1: Representação esquemática dos principais eventos fisiopatológicos envolvidos na DP e as estratégias de tratamento paliativas versus as estratégias modificadoras do curso da doença com o uso de NTFs.



Legenda: A etiologia da DP é altamente complexa e vários mecanismos têm sido relacionados à sua patogênese, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, desdobramento ou agregação de proteínas e alterações no sistema ubiquitina-proteossoma e/ou das vias de degradação lisossomal. Juntamente com outros fatores, eles desencadeiam perda sináptica e morte neuronal. Enquanto os tratamentos atualmente disponíveis visam controlar os principais sintomas clínicos da DP, mas não o processo degenerativo em si, as abordagens terapêuticas ainda em fase experimental pretendem redirecionar a história natural da doença. Os fatores neurotróficos possuem potencial de suplantar tais necessidades. À esquerda da figura, encontra-se a representação esquemática de (1) populações neuronais sob ameaça de fatores externos e o desfecho frente às diferentes estratégias de (2) neuroproteção, (3) neurorestauração e (4) neuroregeneração. As linhas em (1 - 4) indicam a dimensão da população neuronal. DP: doença de Parkinson; DA: dopamina; MAO-B: monoamino oxidase B; COMT: catecol-O-metiltransferase; DDC: DOPA-descarboxilase; RNMDA: receptor N-metil-D-aspartato. Adaptado de RODRIGUES et al., 2014.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DOENÇA DE PARKINSON

A morte neuronal é um traço fundamental em condições neurodegenerativas e está associada a uma ampla gama de disfunções neurológicas do SNC (PRICE et al., 1987). É a partir da maneira como ocorre a degeneração dos neurônios, em termos temporais, que temos a distinção das doenças neurodegenerativas em agudas (acidente vascular cerebral e traumatismo cranioencefálico) ou crônicas (doença de Huntington, esclerose lateral amiotrófica, DA e DP). Apesar disso, não somente o fator tempo discerne as referidas patologias, outros parâmetros fisiopatológicos são conjuntamente decisivos (VIRVE; MARCELLO, 2011). Assim, em doenças neurodegenerativas crônicas, como a DP, temos o reconhecimento de um quadro onde além da progressão gradual de prejuízos estruturais e funcionais à atividade celular do SNC, ocorre a morte massiva de populações neuronais específicas (DUGGER; DICKSON, 2017).

A DP foi primeiramente descrita há cerca de 200 anos, em 1817, quando o médico inglês James Parkinson publicou o trabalho intitulado: “*An Essay on the Shaking Palsy*”. Em seu manuscrito, composto por cinco capítulos, Parkinson relatou minuciosamente e fez inferências sobre a história clínica de seis pacientes, que a posteriori seriam reconhecidas como características peculiares da DP. Desde esse período, a DP foi e vem sendo alvo de estudo de muitos grupos de pesquisa. Todavia, somente cerca de um século após os relatos de Parkinson, identificou-se o principal marcador neuropatológico da DP, postulado por Édouard Brissaud em 1895 e posteriormente confirmada por Konstantin Trétiakoff em 1919. Tal característica refere-se justamente à perda preponderante e excessiva de uma população neuronal em particular, os neurônios dopaminérgicos do mesencéfalo, mais especificamente, da região denominada substância negra parte compacta (SNc) (PARENT; PARENT, 2010).

Os neurônios dopaminérgicos advêm de áreas cerebrais distintas e possuem projeções divergentes que podem ser caracterizadas em quatro principais vias (nigroestriatal, mesolímbica, mesocortical e tuberoinfundibular). Dentre elas, a via nigroestriatal constitui o maior trato dopaminérgico – representando cerca de 80% da dopamina (DA) cerebral – e está diretamente envolvida no controle do movimento voluntário. Essa rota projeta-se rostralmente dos corpos celulares da parte compacta da SN às terminações no estriado, um dos núcleos da base do diencéfalo. Assim, devido a neurodegeneração da SN existente na DP, ocorre uma redução pronunciada nos níveis de DA na região estriatal, levando a distúrbios motores

persistentes. Além disso, observa-se uma redução nos produtos de degradação da DA e na expressão de enzimas envolvidas na sua síntese, como a tirosina hidroxilase (TH) (CHINTA; ANDERSEN, 2005; DAUER; PRZEDBORSKI, 2003).

Somado à degeneração da via dopaminérgica nigroestriatal, a presença dos corpos de Lewy (LBs, do inglês: *Lewy bodies*) é particularmente importante para o diagnóstico definitivo da DP. Este marcador neuropatológico consiste em inclusões citoplasmáticas nucleares formadas por agregados proteicos oxidados, nitrados e ubiquitinados, constituídos predominantemente pela proteína α -sinucleína, além de ubiquitina, parquina e neurofilamentos, bem como subunidades moleculares proteossômicas e lisossomais (GUERRERO et al., 2013). A distribuição dos LBs em diversas estruturas e regiões encefálicas ocorre juntamente ao acometimento de outros sistemas de neurotransmissão além do dopaminérgico. Dentre eles, destacam-se os sistemas glutamatérgico, colinérgico, GABAérgico, noradrenérgico e adrenérgico, devido sua correlação com a progressão da patologia e com o surgimento dos diferentes sintomas clínicos não motores. De fato, parece haver uma correlação direta entre o surgimento das inclusões intraneuronais em determinada região cerebral e, em detrimento ao sistema de neurotransmissão afetado, o aparecimento de danos funcionais relativos ao controle exercido por tal área (BRAAK, H.; BRAAK, 2000).

Ainda não é claro se a formação dos LBs representa um mecanismo desenvolvido por neurônios para impedir o acúmulo de intermediários patogênicos, como agregados da proteína α -sinucleína. O papel fisiológico dessa proteína pré-sináptica está relacionado ao tráfico vesicular, liberação de neurotransmissores e regulação da transmissão sináptica. Contudo, em situações de ordem idiopática, ela pode sofrer falhas em seu envelhecimento e oligomerização, formando dímeros, oligômeros e estruturas fibrilares. Outrossim, evidências crescentes indicam que a α -sinucleína, quando em uma de suas configurações anômalas, pode se espalhar para regiões cerebrais vizinhas e levar ao recrutamento de formas monoméricas da α -sinucleína endógena, com agregação e espalhamento de maneira priônica (MA, J. et al., 2019; MELKI, 2018). A hipótese mais aceita atualmente é de que estes acúmulos proteicos surjam devido a falhas nos mecanismos de degradação proteica, como a autofagia e o sistema ubiquitina-proteassoma (UPS, do inglês: *ubiquitin-proteasome system*) (LEHTONEN et al., 2019).

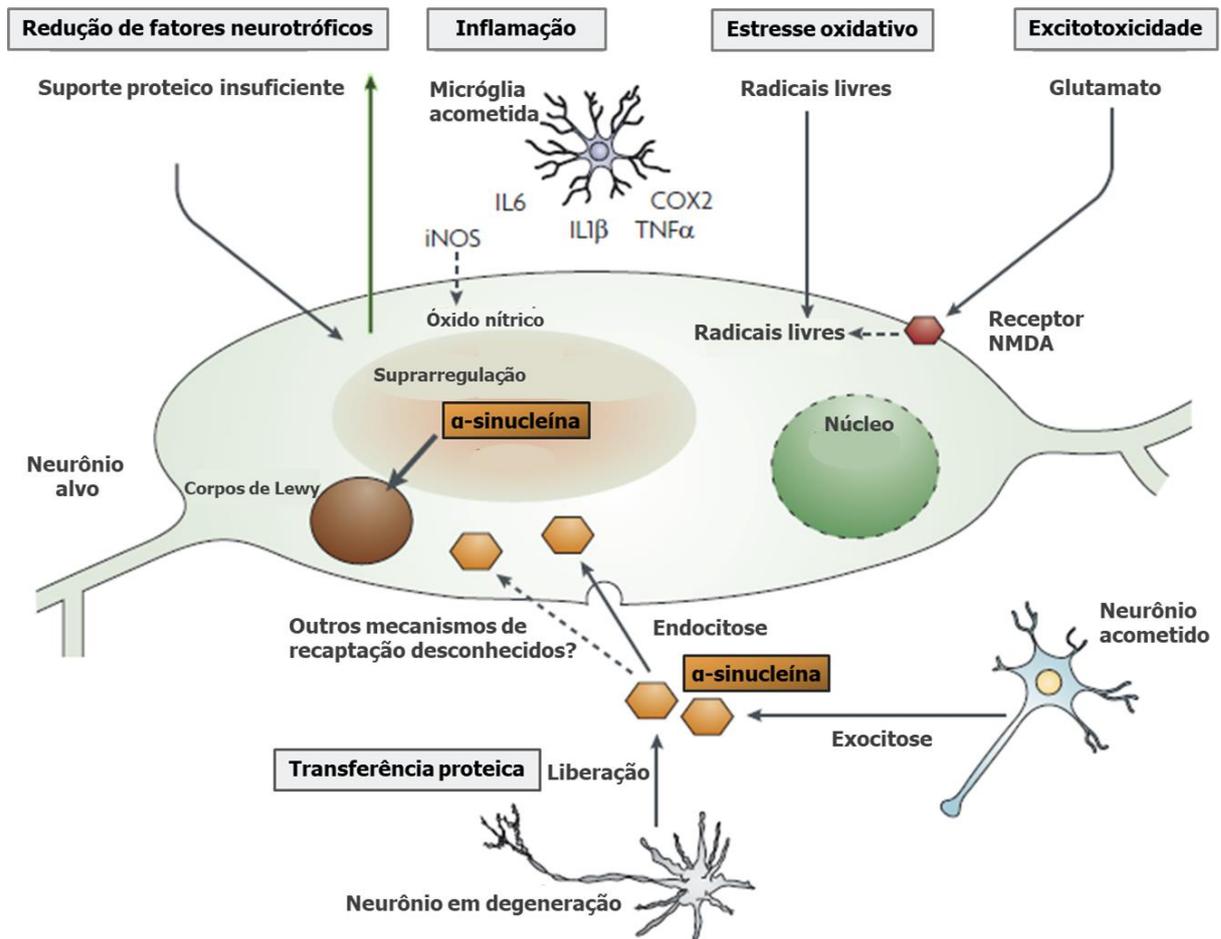
Além dos mecanismos de descontrole da proteólise, com agregação ou desdobramento de proteínas, disfunção do sistema ubiquitina-proteassoma e vias de degradação lisossomal; tem-se o reconhecimento de diversas outras anormalidades celulares envolvidas na fisiopatologia da DP, como disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade e

neuroinflamação. Essa gama de mecanismos de morte celular pode estar interligada através das mesmas vias de toxicidade; atingir diferentes populações neuronais e sistemas de neurotransmissão; e, ainda, estar presente tanto em pacientes com a DP esporádica, quanto em parkinsonianos com histórico de DP familiar (YACOUBIAN; STANDAERT, 2009).

Além disso, a manutenção e sobrevivência das células neuronais depende do controle fundamental efetuado por fatores neurotróficos (NTFs, do inglês: *neurotrophic factors*) e uma desregulação em seus níveis e/ou atividade, pode desencadear vias de morte celular, as quais têm sido denotadas como causa-efeito em diversas condições neurodegenerativas, como a DP (HIRSCH; JENNER; PRZEDBORSKI, 2013; WEIS et al., 2003). Os NTFs são proteínas que, quando secretadas, promovem ativamente crescimento e sobrevivência de neurônios em desenvolvimento. Enquanto em circuitos neuronais maduros desempenham um papel crucial na manutenção homeostática mediada pelos contatos célula-célula e na integralidade da transmissão sináptica de diversos fenótipos celulares (FUMAGALLI et al., 2008). Na revisão realizada por Sarkar e colaboradores, no ano de 2016, referenciou-se o envolvimento de diferentes neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), o fator de crescimento neural (NGF) e o fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF) e seus respectivos receptores na DP – tais NTFs apresentaram níveis drasticamente diminuídos na SN de pacientes parkinsonianos (SARKAR; RAYMICK; IMAM, 2016).

Ademais, tal redução no suporte neurotrófico pode contribuir ativamente e/ou ser influenciada pelos mecanismos de degeneração acima relacionados. A **Figura 2** ilustra a interligação existente entre os diferentes mecanismos elementares da DP, com ênfase na distribuição priônica da α -sinucleína. Como discutido no artigo de revisão de Brundin e colaboradores, a redução do suporte neurotrófico aos neurônios dopaminérgicos (incluindo neurônios enxertados, em casos de terapias celulares), levará a falha na manutenção da homeostase, considerando a necessidade de estímulos tróficos para manter um meio interno normal (BRUNDIN et al., 2008). No entanto, esses mecanismos não agem de forma isolada, podendo um influenciar diretamente na ação do outro. Por exemplo, recentemente, mostrou-se que a α -sinucleína bloqueia sinais pró-sobrevivência promovidos pelo BDNF, ao passo que a interação direta da α -sinucleína com os receptores para o BDNF (TrkB) leva à supressão dos sinais mediados pelo ligante trófico e à morte neuronal. Portanto, essas alterações não necessariamente representam uma via unidirecional e poderiam inclusive convergir de um mesmo evento, como o acúmulo de agregados de α -sinucleína; o qual se especula ser o gatilho para a disfunção sináptica e processo de neurodegeneração (KANG et al., 2017).

Figura 2: Representação esquemática dos principais mecanismos celulares envolvidos com a propagação da α -sinucleína na fisiopatologia da DP.



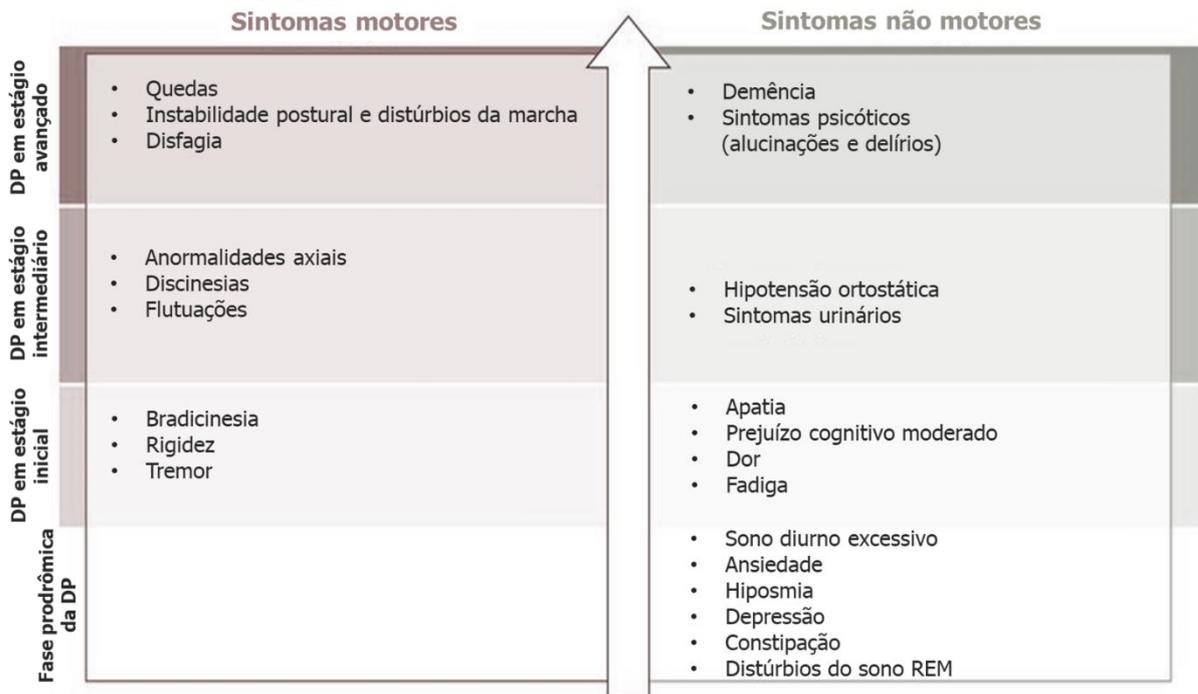
Legenda: Este diagrama ilustra os mecanismos celulares que podem estar subjacentes à propagação da DP. A deficiência de fatores neurotróficos pode levar ao acúmulo e à agregação da α -sinucleína, da mesma forma, supõe-se que o contrário também ocorra (seta verde). Mediadores inflamatórios, incluindo o fator de necrose tumoral- α (TNF α), interleucina-1 β (IL1 β), IL6, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e ciclo-oxigenase 2 (COX2), são suprarregulados no cérebro de pacientes parkinsonianos. Alguns deles possuem correlação positiva com a suprarregulação da α -sinucleína. Além disso, há a ampla evidência do estresse oxidativo exacerbado no cérebro de pacientes com a DP. Os radicais livres podem levar a modificações na α -sinucleína, aumentando sua propensão ao desdobramento. A excitotoxicidade desencadeada pelo excesso de glutamato no estriado dos pacientes, também pode levar ao aumento de radicais livres no citoplasma dos neurônios. Por vez, as células adjacentes também podem ser uma fonte geradora de corpos de Lewy a partir da transferência da α -sinucleína. NMDA: N-metil-D-aspartato. Modificado de BRUNDIN et al., 2008.

Neste contexto, foi proposto recentemente que a etiologia e também a progressão da DP poderia ser dividida em três pontos ou fases, de acordo com fatores influentes sobre sua fisiopatologia: i) gatilhos ou iniciadores; ii) facilitadores; e iii) agravantes. Durante a primeira fase, os “gatilhos”, como toxinas ambientais, provocariam o surgimento da doença no cérebro e/ou nos tecidos periféricos. No entanto, os iniciadores sozinhos seriam insuficientes, exigindo que “facilitadores”, como a senescência celular, leve à repercussão da DP. Após manifestada a doença, os “agravantes”, como o prejuízo na autofagia e propagação da α -sinucleína, estimulariam a progressão da neurodegeneração observada na doença (JOHNSON et al., 2019).

Como visto, os fatores que desencadeiam o processo neurodegenerativo não possuem uma relação temporal de causa e efeito bem estabelecida. Um modelo bem estabelecido para explicar os prejuízos funcionais observados na DP, sugere que a depleção de DA resulte em mudanças na plasticidade de neurônios estriatais. Essas alterações, por sua vez, provocam um desequilíbrio na atividade de vias neuroanatômicas dos núcleos basais [estriado, segmentos externo e interno do globo pálido, núcleo subtalâmico e SN] ao se projetarem através dos seus núcleos de saída para estruturas executoras (como tálamo e córtex motor). Em última instância, essa disparidade na circuitaria motora, levaria ao insucesso no controle da motricidade através da promoção ou supressão inadequada de um determinado movimento (CALABRESI et al., 2014).

Por conseguinte, os sintomas mais evidentes na DP são caracterizados como distúrbios motores incapacitantes e irreversíveis, os quais incluem: tremor de repouso, rigidez muscular, bradicinesia, instabilidade postural, fraqueza muscular e escassez de movimentos voluntários. A presença desses prejuízos motores são determinantes para o diagnóstico da DP e surgem predominantemente como consequência da neurodegeneração dopaminérgica, a qual estima-se ser superior a 70% quando o diagnóstico clínico é estabelecido. Além dos sintomas motores clássicos, sinais e sintomas não motores são observados em pacientes parkinsonianos, como sinais autonômicos (aumento de salivação, seborreia, constipação, vermelhidão e sudorese), ansiedade, depressão, apatia, hiposmia, distúrbios do sono e declínio cognitivo, acompanhado ou não de demência. Os prejuízos não motores observados na DP são associados a falhas na regulação de distintos sistemas de neurotransmissão (além do sistema dopaminérgico) e, em sua maioria, podem ocorrer muito antes dos sintomas motores, em uma fase prodrômica da doença, como ilustrado na **Figura 3** (BRAAK, HEIKO et al., 2004; POEWE et al., 2017a).

Figura 3: Quadro de sintomas clínicos associados à progressão da DP.



Legenda: O diagnóstico da DP ocorre com o aparecimento dos sintomas motores (DP em estágio inicial), tipicamente no início da senescência aos 60 anos, mas pode ser precedido por uma fase prodrômica de anos ou até décadas, caracterizada por sintomas não motores (DP prodrômica). Os sintomas não motores tornam-se cada vez mais prevalentes ao longo da doença, apesar da grande variabilidade na severidade dos sintomas entre os pacientes. A incapacidade progressiva na DP avança à medida que se combinam os prejuízos não motores, à piora dos sintomas motores cardinais e ao surgimento de complicações motoras induzidas pela L-DOPA (DP em estágio intermediário). A evolução das complicações motoras não responsivas à L-DOPA, como instabilidade postural, problemas na marcha (incluindo congelamento) e disfagia, caracterizam a fase com maior gravidade da doença (DP em estágio avançado). REM: movimento rápido dos olhos. Adaptado de POEWE et al., 2017.

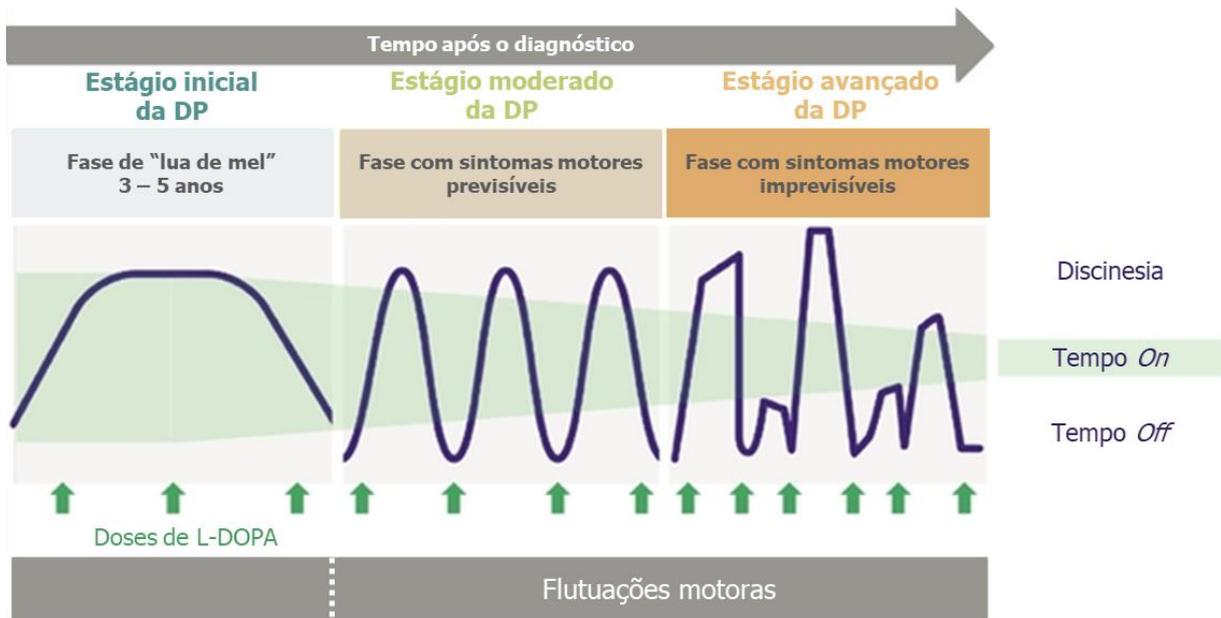
Embora fique evidente que o amplo quadro de sintomas presentes na DP decorre de bases neurobiológicas distintas, a terapia medicamentosa atual é focada essencialmente ao controle dos sintomas motores e à manutenção da atividade neuronal dopaminérgica remanescente. Até o início dos anos 1960, o tratamento medicamentoso da DP foi limitado aos anticolinérgicos (biperideno, metixeno e triexifenidil), visando restabelecer o equilíbrio que existe entre o sistema colinérgico e o dopaminérgico. Entretanto, eles apresentam baixa eficácia e uma alta incidência de efeitos colaterais gastrointestinais e neuropsiquiátricos (KATZENSCHLAGER et al., 2003). A introdução da levodopa (L-DOPA) na terapia da DP, que atua como precursor direto na síntese de DA, em associação com inibidor da enzima responsável pelo seu metabolismo periféricamente, a DOPA-descarboxilase (carbidopa ou benserazida), teve um impacto positivo incontestável. O tratamento com a L-DOPA reduziu significativamente os escores de incapacidade e mortalidade e elevou substancialmente a

qualidade de vida dos pacientes com a DP (MAIER HOEHN, 1983). Atualmente, outras estratégias terapêuticas são também utilizadas em monoterapia ou associadas a L-DOPA com o objetivo de aumentar o tônus dopaminérgico e reduzir os efeitos adversos, como os agonistas dopaminérgicos (bromocriptina, lissurida, pergolida e pramipexol) e inibidores das enzimas de degradação da DA, a catecol-O-metiltransferase (COMT) e a monoamino oxidase B (MAO-B) (entacapona e selegina, respectivamente), além do antagonista glutamatérgico de receptores NMDA (amantadina), o qual é indicado para fases iniciais da DP devido seu efeito modesto sobre a sintomatologia motora (GIROUX, 2007).

Apesar do crescimento no número de opções farmacológicas, a L-DOPA continua como o fármaco de referência para tratar a DP, mesmo após quase 60 anos desde a sua introdução no mercado e inúmeras pesquisas visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Todavia, a utilização da L-DOPA de maneira crônica é associada com o aparecimento de flutuações motoras derivadas da deterioração de fim de dose (fenômeno *wearing-off*) e interrupção súbita de sua ação levando a uma situação "resposta-falha" (fenômeno *on-off*), com oscilações de mobilidade, além do surgimento de discinesias (LIDs, do inglês: *L-DOPA-induced dyskinesia*), caracterizadas por movimentos involuntários anormais (AIMs, do inglês: *abnormal involuntary movements*) (FERNANDEZ, 2012; LEWITT, 2015).

Neste contexto, pacientes que desenvolvem precocemente a DP (antes dos 50 anos) são particularmente mais vulneráveis aos efeitos adversos advindos do tratamento crônico com a L-DOPA. As complicações motoras podem acometer cerca de 80% desses pacientes após 5 anos de tratamento; enquanto cerca de 50% dos pacientes nos casos típicos de apresentação da doença na senescência é atingida durante o mesmo período de tratamento (KOSTIC et al., 1991; POEWE et al., 2017a). Além do aparecimento da doença em menor idade, outros dois principais fatores de risco para o desenvolvimento das complicações motoras são as altas doses de L-DOPA e maior tempo de duração da doença. Assim, apesar da eficácia demonstrada pelo tratamento com a L-DOPA em fases iniciais, a sua associação com o surgimento de efeitos adversos pode, em última instância, ter um impacto negativo na qualidade de vida do paciente parkinsoniano e resultar uma relação custo-benefício desfavorável à sua utilização (MARSDEN; PARKES, 1977). A **Figura 4** ilustra a dinâmica de eventos ocorridos durante o tratamento crônico com a L-DOPA e o surgimento das complicações motoras em diferentes estágios da DP.

Figura 4: Gráfico esquemático que demonstra o padrão de resposta motora frente ao tratamento com a L-DOPA durante a progressão da DP.



Legenda: Esta figura ilustra como a janela terapêutica da L-DOPA se estreita durante a progressão da DP. Nos primeiros anos após o diagnóstico da DP e tratamento com a L-DOPA, os sintomas motores dos pacientes geralmente são bem controlados, período conhecido como fase de "lua de mel". No entanto, à medida que a doença progride, os pacientes tornam-se menos responsivos à L-DOPA. Apesar do aumento na quantidade e frequência de dosagem da L-DOPA, os pacientes em estágios avançados da doença têm períodos mais longos de mobilidade reduzida (período *off*) devido a concentrações plasmáticas da L-DOPA abaixo da faixa terapêutica; além de episódios frequentes de discinesias ou movimentos involuntários anormais devido a concentrações plasmáticas acima da janela terapêutica; e, por conseguinte, curtos períodos de tempo com controle adequado dos sintomas motores (período *on*). Essas flutuações motoras refletem a meia-vida curta do L-DOPA, causada por variações na absorção gastrointestinal e no transporte através barreira hematoencefálica, bem como as alterações farmacodinâmicas estriatais, produzindo diferentes padrões de variação na resposta motora. A presença desses efeitos adversos do tratamento crônico com a L-DOPA está associada a escores de incapacidade elevados e a uma redução na qualidade de vida em pacientes com a DP. Adaptado de THANVI; LO, 2004.

Para um grupo seleto de pacientes cujo não há o controle adequado dos sintomas motores, pode ser considerada a cirurgia para implante de estimulador cerebral profundo (DBS, do inglês: *deep brain stimulation*) em núcleos de saída dos núcleos basais, como o globo pálido interno ou núcleo subtalâmico. O implante do DBS tem como objetivos: a redução na frequência e duração dos períodos *off*; a supressão do tremor refratário ao tratamento medicamentoso; além da redução das LIDs e melhora na qualidade de vida dos pacientes. Apesar da alta taxa de sucesso do procedimento, os critérios de elegibilidade dos pacientes para a intervenção cirúrgica são bastante rigorosos e, de certa forma, restritivos. Além disso, os efeitos do DBS em pacientes com a DP também são limitados ao avanço da neurodegeneração (WEAVER et al., 2005).

De maneira geral, os tratamentos disponíveis para a DP são inicialmente bem-sucedidos no controle dos sintomas motores. Todavia, além da inexistência de tratamentos eficazes no controle dos sintomas não motores, a cronicidade do tratamento terapêutico medicamentoso está associada ao surgimento de diversas complicações e a não estagnação do processo neurodegenerativo. Por essa razão, muito além do que se entender as bases neurobiológicas da DP, um dos grandes desafios e anseios está em desenvolver terapias capazes de descontinuar o processo de neurodegeneração (SULLIVAN; TOULOUSE, 2011). Neste sentido, tem ganho destaque as pesquisas com fatores neurotróficos na DP.

2.2 FATORES NEUROTRÓFICOS

O papel crítico de sinais tróficos na sobrevivência neuronal teve suas primeiras evidências científicas relatadas no último ano da década de 1940, pelo neuroembriologista Viktor Hamburger juntamente à célebre neurologista Rita Levi-Montalcini. Tais pesquisadores fizeram uma série de experimentos clássicos e, dentre outras observações inéditas para a época, evidenciaram que a morte neuronal não é simplesmente consequência de patologias ou manipulações experimentais, mas que ocorre durante o programa natural de desenvolvimento embrionário. A partir do paradigma experimental representado na **Figura 5**, Hamburger e Levi-Montalcini, utilizando embriões de galinha, demonstraram que a morte celular e um decréscimo da população neuronal ocorria fisiologicamente durante o desenvolvimento (em níveis próximos a 50%). Neste contexto, a remoção de um broto de membro durante a fase embrionária com formação das terminações nervosas, levou a uma morte excessiva de neurônios sensoriais em gânglios da raiz dorsal no lado onde houve a extirpe do broto de membro (em torno de 90%). De forma semelhante, a adição de um membro extra durante a fase embrionária, levou a um aumento na sobrevivência dos neurônios (em torno de 75%) (HAMBURGER; LEVI-MONTALCINI, 1949).

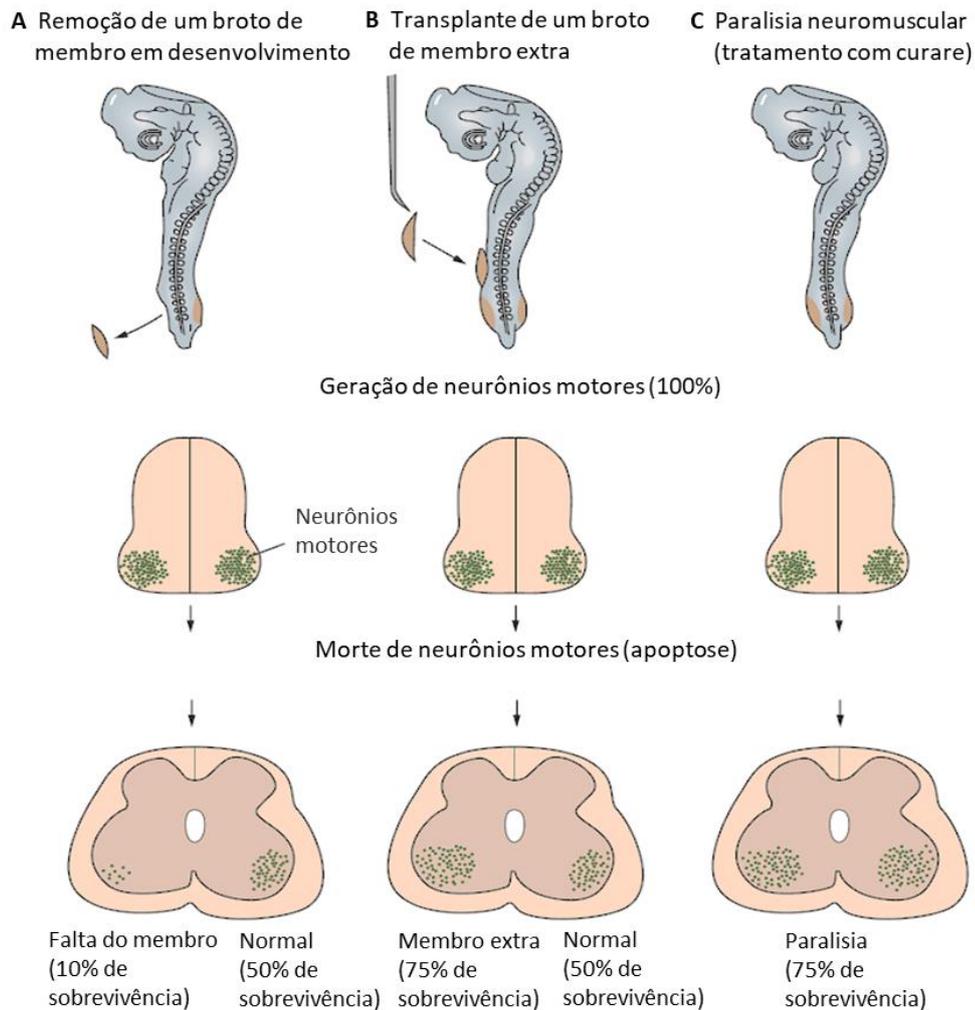
Essas primeiras descobertas sobre a vida e a morte de neurônios sensoriais foram rapidamente estendidas para o SNC. Atualmente, sabe-se que o fenômeno de superprodução neuronal, seguido por uma fase de morte neuronal, ocorre na maioria das regiões do SNP e do SNC de vertebrados (FENRICH; GORDON, 2004). Ademais, foi a partir dessa série de experimentos em gânglios da raiz dorsal que chegou-se à conclusão de que: células-alvo de um determinado neurônio, ou próximas a ele, secretam moléculas em pequenas quantidades (na época referidas como “nutrientes essenciais”) e que a captura desses nutrientes essenciais pelos

terminais nervosos é necessária e definitiva para a sobrevivência do neurônio (HAMBURGER; LEVI-MONTALCINI, 1949).

Assim, as descobertas de Hamburger e Levi-Montalcini forneceram subsídios para a formulação da hipótese neurotrófica, a qual fornece uma explicação de como os campos-alvo influenciam o tamanho das populações neuronais que os inervam. Seu princípio fundamental é que a sobrevivência dos neurônios em desenvolvimento depende do fornecimento de suprimento trófico, sendo este sintetizado em quantidades limitadas em seus campos-alvo. Essa hipótese foi confirmada durante a década de 1950 e no ano de 1960, quando Levi-Montalcini e Stanley Cohen purificaram a proteína conhecida atualmente como fator de crescimento neural (NGF) e demonstraram que, quando produzida por células-alvo, a molécula recém caracterizada mantinha a sobrevivência de neurônios sensoriais e simpáticos *in vitro*. Além de que, anticorpos neutralizantes contra o NGF, levariam a elevada perda de neurônios sensoriais e simpáticos *in vivo* (COHEN, 1960; COHEN; LEVI-MONTALCINI, 1956).

A hipótese neurotrófica mantém-se válida até os dias atuais e estudos posteriores ampliaram o conhecimento acerca dela. Atualmente, sabe-se que múltiplos NTFs podem regular a sobrevivência de uma mesma população neuronal. Por exemplo, alguns neurônios dependem de vários NTFs diferentes atuando simultaneamente ou sequencialmente durante a inervação do campo-alvo. Além disso, existem aspectos de ação dos NTFs que não estão totalmente de acordo com a hipótese neurotrófica clássica. Por exemplo, é sabido que há a dependência de algumas populações de neurônios em determinados NTFs durante o próprio processo de morte celular, ou seja, que não é necessariamente a ausência ou insuficiência dos NTFs que definirá a capacidade de sobrevivência neuronal. Além disso, há evidências de que em algumas situações os neurônios são supridos e regulados pela ação de NTFs derivados por via autócrina, e não necessariamente de forma parácrina através do contato-alvo. No entanto, apesar da crescente riqueza de informações sobre os múltiplos papéis e modos de ação dos NTFs, a hipótese neurotrófica permanece sendo a melhor explicação para como os campos-alvo neuronais regulam a densidade de inervação, especialmente no SNP em desenvolvimento (DAVIES et al., 1996). Além disso, desde as descobertas pioneiras sobre a existência e função do NGF, datadas especialmente da década de 1950, diversos outros NTFs foram caracterizados e tiveram seus mecanismos de ação identificados, bem como seus locais de atuação (XIAO; LE, 2016).

Figura 5: Representação esquemática da primeira evidência experimental que subsidiou a teoria acerca da existência de NTFs.



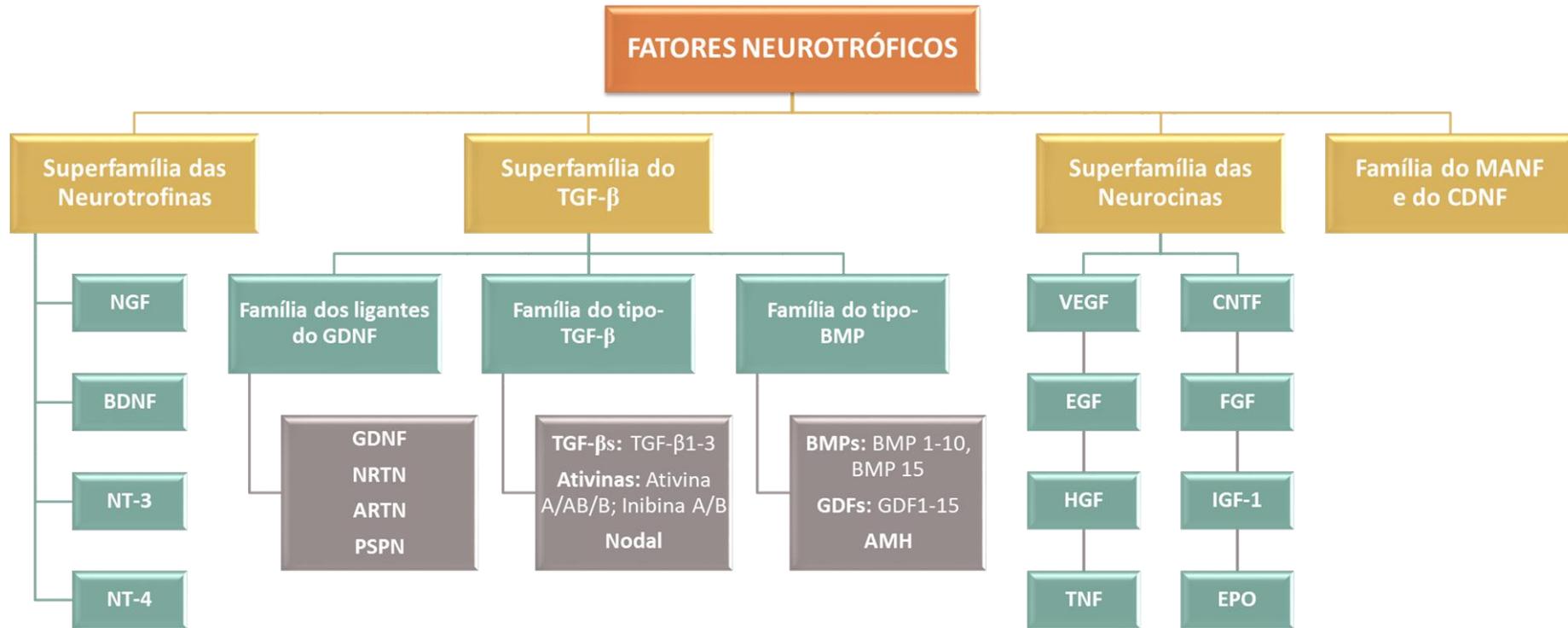
Legenda: A figura representa as etapas do experimento realizado por Viktor Hamburger e Rita Levi-Montalcini, no ano de 1949, mostrando como a presença ou ausência de alvos periféricos afeta o número de neurônios motores em gânglios da raiz dorsal de embriões de galinha em desenvolvimento. (A) Primeiramente um brotamento do membro foi removido de um embrião de galinha com 2,5 dias de idade, logo após a chegada dos nervos motores ao tecido. Uma secção da medula espinal lombar, avaliada uma semana mais tarde, revelou que poucos neurônios motores sobreviveram no lado da medula espinal destituído do membro. O número de neurônios motores no lado contralateral (com o membro intacto) era normal. (B) Em um segundo grupo experimental, um broto extra de membro foi enxertado no lado de um membro preexistente, antes do período normal de morte dos neurônios motores. Uma secção da medula espinal lombar, avaliada duas semanas mais tarde, mostrou um aumento do número de neurônios motores no lado com o membro adicional. (C) Ainda, evidenciaram que o bloqueio da atividade neuromuscular com a toxina curare, que bloqueia os receptores de acetilcolina, resgatou muitos neurônios motores que fisiologicamente morreriam (o curare pode agir pelo aumento da liberação de fatores tróficos a partir do músculo inativo) (KANDEL et al., 2014).

Atualmente, os NTFs são subclassificados em superfamílias de moléculas distintas, que compreendem: a superfamília das neurotrofinas; a superfamília do TGF- β ; a superfamília das neuroquinas (citocinas neurotróficas); e a mais recentemente caracterizada, família do fator neurotrófico derivado de astrócitos mesencefálicos (MANF) e do fator neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF). Apesar da vasta gama de famílias, cada um dos NTFs apresenta singularidades que os tornam únicos, como: localizações distintas no SNC e SNP; mecanismos de ação com a ativação de diferentes subtipos de receptores e vias de sinalização; e atividade trófica sobre diferentes populações neuronais (ARON; KLEIN, 2011). A **Figura 6** demonstra a classificação dos NTFs e as moléculas pertencentes a cada uma das superfamílias.

A definição das funções e modos de ação dos NTFs também apresentou progressos. Na atualidade, os NTFs são definidos como um grupo heterogêneo de polipeptídeos solúveis que regulam o desenvolvimento, manutenção, função e plasticidade no SNP e SNC. É sabido que eles podem ser sintetizados tanto por neurônios quanto por células adjacentes. Assim, a presença de uma vasta matriz extracelular torna-se um fator significativo na sua ação e no processo proteção e reparação que desempenham. No SNC, a capacidade de regeneração é considerada inferior à do SNP devido a modesta matriz extracelular e a presença de fatores inibitórios ativos no microambiente neuronal. Outra distinção na dinâmica de atuação dos NTFs, refere-se ao seu papel nos diferentes estágios da vida. Durante o desenvolvimento os NTFs regulam o processo de morte celular natural, enquanto na vida pós-natal suas ações estão primordialmente voltadas à preservação das inervações e comunicações alvo, garantindo eficácia sináptica e sobrevivência (ARON; KLEIN, 2011; FENRICH; GORDON, 2004).

Dada a significância dessa família de biomoléculas, modificações como: um declínio na produção de NTFs; transporte anterógrado e/ou retrógrado inadequado de NTFs e de seus receptores; mecanismos de transdução de sinais comprometidos; envelhecimento celular; mutações e/ou polimorfismos em sua estrutura, têm sido atribuídas à neurodegeneração patológica. Além disso, a capacidade que possuem em regular a diferenciação neuronal, a manutenção do fenótipo e da atividade sináptica e proteger neurônios maduros em lesões mecânicas, tóxicas ou isquêmicas, torna-os alvo na investigação e terapia de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas (KRAMER et al., 2007; TOULORGE; SCHAPIRA; HAJJ, 2016). Como veremos, o GDNF e neurturina (NRTN), são os NTFs mais amplamente estudados no contexto da DP, justamente por possuírem propriedades tróficas primárias sobre neurônios dopaminérgicos.

Figura 6: Diagrama com a classificação dos NTFs de acordo com sua estrutura e função.



Legenda: Figura com a classificação atual das famílias de NTFs. NGF: fator de crescimento neural; BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro; NT-3: neurotrofina-3; NT-4: neurotrofina-4; GDNF: fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais; NRTN: neurturina; ARTN: artemina; TGF-β: fator de crescimento transformador-β; BMP: proteína morfogenética óssea; GDF: fator de diferenciação de crescimento; AMH: hormônio anti-Mülleriano; PSP: persefina; VEGF: fator de crescimento endotelial vascular; CNTF: fator neurotrófico ciliar; EGF: fator de crescimento epidérmico; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; HGF: fator de crescimento de hepatócitos; IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1; TNF: fator de necrose tumoral; EPO: eritropoietina. Baseado em LEVY et al., 2005; LINDHOLM et al., 2007.

2.2.1 Fatores neurotróficos na DP

2.2.1.1 O estado da arte da história até a atualidade

[E tudo começou em 1991...]. Na cidade de Boulder, no Colorado (EUA), estava sendo feita uma pesquisa que ainda traria vários deslumbres para a terapêutica da DP. O Dr. Leu-Fen Lin e o Dr. Frank Collins – ambos cientistas pesquisadores de uma pequena empresa de biotecnologia chamada Synergen – isolaram uma proteína que nomearam de fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF). Então, em 1993, eles compartilharam sua descoberta em uma publicação na *Science*: “*GDNF: A Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor for Midbrain Dopaminergic Neurons*” (LIN et al., 1993).

O GDNF é uma das drogas mais pesquisadas para o uso terapêutico na DP, especialmente porque os primeiros dados obtidos apresentaram resultados positivos. Logo após o relatório original de caracterização do GDNF, começaram a ser publicados os relatos de suas propriedades neuroprotetoras e restauradoras em modelos da DP baseados no uso de toxinas. O potencial do GDNF foi demonstrado em modelos da DP em cultura de células (HOFFER et al., 1994), em roedores (TOMAC et al., 1995); e logo em seguida, em primatas não-humanos (GASH et al., 1996). É importante ressaltar que esses resultados foram replicados de forma independente inúmeras vezes e há uma grande quantidade de pesquisas investigando todos os aspectos do GDNF em modelos da DP (TENENBAUM; HUMBERT-CLAUDE, 2017).

[... E é aqui que a viagem na montanha-russa começa ...]. Como resultado da gama de resultados positivos da pesquisa básica e pré-clínica em modelos da DP, muitos pesquisadores ficaram empolgados com o fato de que, talvez, o Dr. Lin e o Dr. Collins estivessem de frente com a tão procurada: cura para a DP. Então, em 1994, a empresa de biotecnologia Synergen foi comprada pela empresa farmacêutica Amgen – que posteriormente deteve todos os direitos sobre o GDNF e seu uso na DP. Com base nos resultados encorajadores dos estudos em animais, a Amgen rapidamente iniciou testes clínicos para avaliar se os efeitos do GDNF seriam reproduzidos em humanos (VASTAG, 2010).

A primeira tentativa em tratar pacientes com a DP através de NTFs deu-se, portanto, com o GDNF no ano de 1996. Infusões intracerebroventriculares (i.c.v.) da proteína foram administradas mensalmente, durante um período de 6 ou 8 meses, para 50 pacientes que

participaram de um ensaio clínico¹ de fase I – II, randomizado, duplo-cego e controlado por placebo; o qual foi seguido por um estudo de fase aberta por mais 20 meses com 16 dos pacientes tratados com o GDNF recombinante humano (r-metHuGDNF, Liaternin®). Nesse ensaio clínico, todos os pacientes com DP idiopática apresentavam escores de gravidade de Hoehn e Yahr² de 3 - 5 na fase *off* e 1 - 3 na fase *on* (estágios da DP entre moderado a severo). Outro detalhe diz respeito às doses utilizadas, que variaram entre 25 e 4000 µg, com administrações em bolus ou escalonáveis em coortes independentes (NUTT et al., 2003).

O ensaio clínico com o GDNF (i.c.v.), no entanto, não demonstrou quaisquer resultados de melhora na Escala Unificada de Avaliação da DP (UPDRS)³. Embora em primatas não-humanos a abordagem com infusão i.c.v. de GDNF tenha resultado em recuperação funcional, é plausível que em humanos a proteína recombinante não tenha atingido a região-alvo em quantidades suficientes. Além disso, foi evidenciado uma série de efeitos adversos, dentre eles, sintomas agudos e transitórios (pós-administração) como parestesias, náuseas e vômitos; além de efeitos secundários e persistentes, sendo os mais relevantes: dores de cabeça, perda de peso (associada à anorexia) e sinal de Lhermitte (quando, a partir de uma flexão da coluna cervical, há a sensação transitória de um choque elétrico súbito que percorre a coluna e se irradia até os membros) (NUTT et al., 2003). Assim, apesar de o GDNF ter apresentado efeitos neurorestauradores robustos sobre sintomas motores e à integridade de neurônios nigroestriatais em diversos modelos animais da DP, o primeiro grande estudo em pacientes não refletiu tais benefícios, reduzindo as altas expectativas com as quais se iniciaram os ensaios.

¹ Ensaios Clínicos – Fase I: Têm por objetivo proceder a uma avaliação inicial da segurança e tolerabilidade do novo medicamento, bem como do perfil farmacocinético e farmacodinâmico. Dados de eficácia não são o objetivo principal dessa fase. Fase II: Através dos ensaios dessa fase pretende-se confirmar se a droga apresenta efeito terapêutico ou toxicidade e apresenta-se o regime terapêutico (a dose e a frequência de administração). Fase III: São estudos comparativos, necessários para demonstrar a segurança, eficácia e benefício terapêutico de uma nova droga em comparação com um medicamento padrão e/ou placebo (envolve centenas a milhares de pessoas). Fase IV: Estudos realizados após a obtenção da autorização de introdução no mercado, realizados para acompanhamento da segurança e eficácia do novo medicamento a longo prazo. Ensaio Clínico Multicêntrico: estudo realizado de acordo com um único protocolo, em mais de um centro. Ensaio Clínico Aberto x Duplo-cego: estudo sem ou com ocultação do tratamento para ambos, pesquisador e paciente.

² Escala Modificada de Hoehn & Yahr (H&Y) – Classificação da DP de acordo com os sintomas motores, onde: em estágios 1 a 3 = incapacidades leve a moderada; de 4 e 5 = incapacidade grave. Estágio 0: nenhum sinal da doença; Estágio 1: doença unilateral; Estágio 2: doença bilateral sem déficit de equilíbrio; Estágio 3: doença bilateral leve a moderada, com alguma instabilidade postural; Estágio 4: incapacidade grave; Estágio 5: paciente acamado e dependente.

³ Escala Unificada de Avaliação da DP (UPDRS) – A UPDRS é dividida em seis critérios de avaliação: (1) estado mental; (2) atividades de vida diária; (3) exame motor; e relação com complicações na terapia: (4) LIDs; (5) flutuações clínicas; (6) outras complicações; contando com 42 itens de análise no total. Todos os 6 módulos podem ser analisados no estado *on* e *off* da medicação, respectivamente: quando o paciente está sob o efeito da droga antiparkinsoniana, ou com concentrações abaixo da faixa terapêutica da droga. Usualmente, em ensaios clínicos de novos fármacos a escala motora na fase *off* é a mais frequentemente avaliada.

Em retrospectiva aos efeitos adversos já mencionados, atribuídos à estimulação mediada pelo GDNF em regiões cerebrais extraestriatais e devido à falta de efeito terapêutico frente à incapacidade do GDNF se difundir para além do sistema ventricular (como visto pela análise *post-mortem* de um paciente) (KORDOWER, J. H. et al., 1999), a Amgen suspendeu o estudo prematuramente. Infelizmente, não seria a última vez que a empresa interromperia um teste clínico com o GDNF. Neste ponto, a Amgen aparentemente havia arquivado o uso do GDNF – seriam necessários outros dois anos antes de qualquer outro teste clínico com o NTF.

Durante esses anos, vários grupos de pesquisa estavam interessados em conduzir ensaios clínicos com o GDNF na DP, até que finalmente a Amgen concordou em fornecer a droga a uma equipe de pesquisa no Frenchay Hospital em Bristol (Reino Unido) (VASTAG, 2010). Diferentemente da tentativa falha da administração i.c.v. recém experimentada, iniciou-se em Bristol um pequeno ensaio clínico aberto de fase I com infusão contínua de GDNF diretamente no putâmen (considerada a região de maior desnervação dopaminérgica no estriado). Neste estudo, 5 pacientes com DP idiopática e importante comprometimento funcional foram tratados a partir de cânulas bilateralmente implantadas e conectadas a uma bomba osmótica para infusão diária e ininterrupta de GDNF. As doses de GDNF variaram de 14,4 - 43,2 µg/putâmen/dia, durante 1 ano. Como resultado desse teste clínico de fase I, atestou-se primeiramente a segurança de tal intervenção, com a ausência de efeitos adversos graves – o sinal de Lhermitte foi o único efeito indesejado consistentemente presente; além disso, obteve-se uma melhora substancial da função motora e das atividades realizadas cotidianamente. Em 12 meses, a pontuação na UPDRS para indicadores da função motora da fase *off* demonstrou um acréscimo de cerca de 39%; além de uma melhora significativa observada nas atividades diárias em aproximadamente 61%; e uma redução nos escores de LIDs em torno de 64% (com ausência na fase *off*). O benefício clínico foi associado a aumentos significativos na captação estriatal de DA [próximos a 28%; visualizado indiretamente por tomografia por emissão de pósitrons (PET) para ¹⁸F-dopa, como uma medida da integridade pré-sináptica dopaminérgica], sugerindo-se efeitos restauradores fenotípicos e não apenas estruturais (GILL, S. S. et al., 2003).

Dada a prosperidade do desfecho inicial, esse estudo aberto estendeu-se por mais 12 meses e resultados semelhantes foram evidenciados, assegurando-se a tolerabilidade do tratamento a longo prazo e melhora clínica sustentada e progressiva. Inclusive, os 5 pacientes que iniciaram os testes com grau de incapacidade considerado moderado (III, segundo H&Y), finalizaram o segundo ano de tratamento com a doença classificada como leve (H&Y próximo a I) (PATEL, N. K. et al., 2005). Achados posteriores, advindos da análise *post-mortem* do

tecido cerebral de um dos pacientes deste estudo (o único que apresentava sintomas unilaterais e, por consequência, o tratamento no putâmen foi unilateral), revelaram que no putâmen ipsilateral à infusão de GDNF houve um aumento de mais de cinco vezes na imunorreatividade para TH, além de um maior brotamento de fibras neuronais (evidenciado pela marcação para a fosfoproteína associada ao crescimento 43 – GAP43, expressa principalmente em neurônios em desenvolvimento e durante a regeneração axonal) (LOVE et al., 2005). Mais recentemente, um estudo de caso com um dos 5 pacientes há anos tratado, demonstrou que os efeitos significativamente positivos do GDNF ainda estavam presentes, mesmo após três anos da última administração do NTF (PATEL, NIKUNJ K. et al., 2013).

De maneira independente, pesquisadores na Universidade de Kentucky replicaram vários dos paradigmas do teste clínico realizado em Bristol em um outro estudo aberto de fase I. Novamente, a infusão de GDNF intraputâmen conferiu um notável benefício aos pacientes. Neste estudo, 10 pacientes com DP moderada a grave receberam o GDNF por um sistema de liberação controlado, que diferia do usado por Gill e colaboradores em três questões: (1) o cateter utilizado possuía múltiplas saídas ao invés de saída única; (2) o cateter foi implantado unilateralmente em todos os participantes do teste e; (3) o esquema de liberação do NTF foi pulsado, a fim de promover uma entrega melhorada por convecção (CED). Doses crescentes de GDNF foram então utilizadas durante 6 meses (3, 10 ou 30 µg administradas diariamente, em um regime de tratamento de 2 meses com cada uma das doses) e após um mês de interrupção, essa primeira fase do estudo estendeu-se por mais 6 meses (utilizando apenas a maior dose de GDNF). Após os 12 meses de tratamento, os pacientes apresentaram uma melhora de, respectivamente, 38 e 42% nos estados *on* e *off*, de acordo com a pontuação total da UPDRS. Ainda que com benefícios clínicos certificados, os participantes tiveram a suspensão de seus tratamentos após esse primeiro ano de tratamento. Durante os 12 meses seguintes, acompanhou-se os pacientes e foi certificado que os benefícios do GDNF se mantiveram por 9 a 12 meses após a descontinuação do tratamento (SLEVIN et al., 2007; SLEVIN et al., 2005). Em suma, a administração intraputâmen unilateral do GDNF repercutiu em efeitos bilaterais positivos e relativamente prolongados, reacendendo a esperança da terapia com o GDNF na DP.

Paralelamente aos resultados promissores dos primeiros ensaios clínicos abertos, a Amgen, proprietária do Liatermin®, iniciou um teste clínico de fase I-II, multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, envolvendo 34 pacientes com DP idiopática em estágio avançado. Após 6 meses da administração de GDNF intraputâmen, foi demonstrado um efeito positivo do tratamento através do aumento da captação de DA estriatal por PET

(diferença de 32,5% versus os pacientes controle). Entretanto, tal efeito foi aparentemente insuficiente para fornecer qualquer benefício funcional, uma vez que não houveram diferenças estatísticas nas pontuações da UPDRS para com o grupo placebo. Em contraste aos ensaios abertos prévios, que incluíam esquemas de escalonamento de dose, neste estudo da Amgen todos os pacientes receberam infusões intraputâmen bilaterais em dose constante de GDNF e menor do que a utilizada nos ensaios abertos (15 µg/putâmen/dia) (LANG et al., 2006).

Ademais, ainda houveram diferenças entre os tipos de cateteres cerebrais utilizados nos três estudos, com distinções em seus diâmetros, número de saídas (acessos ao putâmen), além do modo de liberação (constante ou pulsado); sendo discutível o quanto isso pode ter interferido nos resultados obtidos em cada um dos ensaios (MORRISON; LONSER; OLDFIELD, 2007). Por exemplo, o protocolo do sistema de entrega e infusão utilizado por Lang e colaboradores foi reproduzido em um estudo com macacos-rhesus e os resultados demonstraram que, de fato, havia um gradiente de concentração acentuado no ponto de injeção do GDNF, sugerindo um volume limitado de distribuição do NTF no putâmen. A partir dos dados de primatas não-humanos, a biodisponibilidade calculada para os pacientes seria de apenas 2 - 9%. O problema com o método usado estaria relacionado a uma infusão contínua e lenta, que resultaria em acúmulo de GDNF na ponta do cateter, causando toxicidade local e distribuição precária, contribuindo para a falta de efeito observada (SALVATORE et al., 2006).

Posteriormente, foram detectados anticorpos anti-GDNF em 18 dos 34 pacientes do estudo conduzido por Lang e financiado pela Amgen (uma proporção maior do que a pré-existente no início do tratamento – 6:34). A ocorrência de autoanticorpos contra citocinas e NTFs é discutida na literatura e sugere-se que eles exerçam um papel meramente regulador; não há evidências de que autoanticorpos pré-existent aumentem o risco do desenvolvimento de anticorpos neutralizantes após o tratamento com proteínas terapêuticas. No entanto, em 4 dos 18 pacientes que detectou-se os autoanticorpos, também verificou-se atividade neutralizante anti-r-metHuGDNF, podendo este ser outro dos motivos pelo qual não foram vistos benefícios funcionais do tratamento com o GDNF (TATAREWICZ et al., 2007). Tais achados e inferências, juntamente com os dados encontrados a posteriori de perda de células granulares e de Purkinje no cerebelo de macacos tratados com GDNF (4:15 – tratamento com dose de 100 µg/dia) (HOVLAND et al., 2007), levaram a completa descontinuação do programa pela Amgen, que inicialmente estava programado para sucessão por mais 24 meses.

Em meio a este cenário, outros membros da família de NTFs do GDNF estavam sendo testados em modelos da DP, especialmente a NRTN, que demonstrara fornecer suporte trófico

robusto a neurônios dopaminérgicos mesencefálicos (HORGER et al., 1998; KOTZBAUER et al., 1996). Perante seus efeitos neurorestauradores na via nigroestriatal semelhantes ao GDNF, a NRTN rapidamente avançou para estudos clínicos. Entretanto, foi utilizada uma nova forma de entrega para o NTF através da terapia gênica. Existem duas formas gerais de terapia gênica: *ex vivo* e *in vivo*; nos últimos anos esta última tem se destacado para aplicação em doenças do SNC, como a DP. A terapia de genes *in vivo* geralmente envolve a construção de um vetor viral projetado para expressar apenas a proteína terapêutica. Assim, uma vez administrado no paciente, o constructo entra nas células subjacentes ao local da injeção, deposita seu transgene no núcleo das células do hospedeiro e a proteína alvo é expressa, podendo atuar de forma autócrina e/ou parácrina. De um modo geral, a terapia gênica foi gradualmente sendo proposta como um meio para melhorar a entrega de proteínas para o SNC. Além de possibilitar uma melhor distribuição da proteína na região alvo e reduzir o potencial imunogênico (RODRÍGUEZ-NOGALES et al., 2016).

Na verdade, a terapia gênica no contexto da DP iniciou a partir da pesquisa básica com o GDNF – tanto em roedores (CHOI-LUNDBERG et al., 1997), quanto em primatas não-humanos (KORDOWER, JEFFREY H. et al., 2000), mas foi com a NRTN que surgiram os primeiros ensaios clínicos baseados nessa estratégia. Uma empresa de biotecnologia chamada Ceregene estava à frente dessa abordagem e em 2006 (10 anos após o primeiro teste com GDNF em pacientes com DP) eles iniciaram ensaios com o CERE-120®, uma droga baseada na inserção da NRTN a um vírus adenoassociado (AAV2-NRTN); ou seja, um vetor contendo o DNA recombinante humano (rh) para contínua expressão do NTF (MARKS, W. J. et al., 2008).

Primeiramente, um estudo de fase I foi conduzido de maneira aberta e direcionado a um pequeno grupo de pacientes com DP classificada entre moderada a grave, onde: 6 pacientes receberam uma dose de 1.3×10^{11} genomas vetoriais (gv) e outros 6 uma maior dose de 5.4×10^{11} gv; em 4 sítios do putâmen; bilateralmente. O procedimento foi bem tolerado e demonstrou ser seguro, sem nenhum efeito adverso significativo durante os 12 meses de acompanhamento. Medidas secundárias com parâmetros da função motora, demonstraram uma melhora logo após o primeiro mês de avaliação e manutenção dessa resposta por todo o período de supervisão (uma média de 36% de melhora nos escores motores do período *off*); além de um aumento médio de 2 - 3 horas no tempo sem LIDs durante a fase *on*. Para ambos os parâmetros, as duas doses apresentaram efeitos estatisticamente semelhantes (MARKS, W. J. et al., 2008).

A partir desses resultados a Ceregene iniciou um ensaio clínico de fase II, com o intuito de realmente avaliar a eficácia do CERE-120®. Para isso, foram recrutados 58 pacientes em 9

centros de pesquisa, tratando-se de um estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego e controlado por SHAM (cirurgia simulada). Os participantes foram aleatorizados entre receber injeções bilaterais no putâmen de CERE-120® (na maior dose utilizada no estudo de fase I) ou ter a cirurgia simulada. Após 12 meses da administração do NTF, não foram encontradas diferenças entre os dois grupos com base no desfecho primário de pontuação motora da UPDRS. Apesar disso, nos 6 meses subsequentes um subgrupo de pacientes tratados com o CERE-120® mostrou uma melhora significativa frente ao tratamento (MARKS et al., 2010).

Além da avaliação *in vivo*, foram feitas análises histológicas no tecido cerebral de dois pacientes que receberam o CERE-120® intraputâmen e morreram, menos de três meses após, por eventos não relacionados com a administração. Comparou-se a expressão de NRTN e TH no estriado e na SN às de primatas não-humanos tratados com o NTF nas mesmas condições. Os resultados indicam que a terapia genética direcionou a expressão da proteína neurotrófica seletivamente para a região encefálica de maior degeneração. Contudo, ficou claro que o direcionamento ao sistema nigroestriatal é afetado ante as deficiências na integridade do trato, que aparentemente limitam o transporte axonal dos campos terminais dos neurônios em degeneração para seus corpos celulares. A expressão diferencial da NRTN na SN foi evidenciada somente em primatas não-humanos, para os pacientes com DP os níveis de NRTN se detiveram ao putâmen. Assim, a administração convencionalmente utilizada intraputâmen (empregada em vários estudos com resultados inconclusivos) provavelmente vem fornecendo níveis de NTF aquém do ideal ao corpo celular dos neurônios, de maneira a limitar significativamente efeitos biológicos. Em suma, concluiu-se que uma estratégia para que a terapia gênica realmente superasse os problemas de entrega e atingisse os benefícios terapêuticos esperados, seria dirigindo-a diretamente aos corpos celulares na SN além do direcionamento tradicional para ao estriado (BARTUS, RAYMOND T. et al., 2011).

Assim, sequencialmente foi conduzido um ensaio de fase I e II com a administração intraputâmen e intranigral do CERE-120®. Na fase I do estudo, avaliou-se a abordagem durante 2 anos dando origem a um conjunto de resultados de longo prazo que comprovou a segurança do tratamento. Esses resultados foram obtidos de duas coortes de 3 pacientes, tratados com o CERE-120® no estriado (5.4×10^{11} ou 24.0×10^{11} gv) e na SN (4.0×10^{11} gv), sendo as doses determinadas com base no dimensionamento de doses interespecies e projetadas para cobrir adequadamente o risco de disseminação para estruturas não-nigrais (BARTUS, R. T.; BAUMANN; BROWN; et al., 2013).

Na etapa II do ensaio, para avaliação da eficácia, 51 pacientes foram randomizados para receber CERE-120® (1.0×10^{12} no estriado e 2.0×10^{11} na SN) ou a cirurgia simulada em um estudo duplo-cego e multicêntrico. Entretanto, novamente não foram vistas melhoras claras, mesmo com a administração adicional na SN. A não ser, quando se estratificou os pacientes em três grupos, em diagnosticados com a DP ≤ 5 anos, entre 6 – 9 e \geq a 10 anos. Nesse caso, foi evidenciada uma diferença significativa em parâmetros da função motora e desfechos secundários somente em pacientes tratados com CERE-120® e histórico da DP por menos de 5 anos, os quais apresentaram uma melhora clara em comparação ao grupo SHAM. Ademais, no subgrupo de pacientes com resultados positivos da aplicação intraputâmen do CERE-120®, no trabalho de Marks et al., (2010), também não haviam indivíduos diagnosticados há mais de 10 anos (WARREN OLANOW et al., 2015).

Toda essa gama de resultados obtidos pela Ceregene levantou e reforçou diversos questionamentos sobre a existência de possíveis vieses decorrentes dos desenhos experimentais utilizados em ensaios clínicos. Por exemplo: (1) a presença de efeito placebo de longa duração (uma vez que logo nos primeiros meses após o tratamento com o NTF não foram observadas sequer tendências) e/ou; (2) a possibilidade de um atraso para o início da resposta terapêutica (dado o atraso decorrente das partículas vetoriais até a transferência gênica do cDNA aos neurônios dopaminérgicos e a expressão do NTF em níveis suficientes), além de que; (3) a injeção do vetor viral somente no putâmen não levaria a um aumento na expressão de NTF na SN (podendo a integridade do transporte retrógrado axonal ser decisiva para visualização de um efeito funcional) e, por conseguinte; (4) apenas um subgrupo de pacientes seria responsivo a terapia baseada em NTFs, aqueles com a DP em estágios iniciais (como visto nos ensaios com pacientes diagnosticados há menos do que 5 anos, que provavelmente apresentavam uma quantidade maior de neurônios dopaminérgicos remanescentes) (WARREN OLANOW et al., 2015). Todavia, apesar da riqueza dos dados e enorme contribuição científica da série de estudos desenvolvidos pela Ceregene com o CERE-120®, o NTF que apresenta maior potencial de futuramente atingir o mercado, inclusive, por angariar a maior parte dos fundos de investimentos e atenção midiática, trata-se ainda do GDNF. Tanto que os mais recentes resultados de ensaios clínicos com NTFs na DP referem-se justamente a ele.

No primeiro trimestre desse ano foram publicados os resultados de mais uma tentativa do grupo de pesquisadores de Bristol, os quais conduziram o primeiro ensaio clínico aberto de sucesso com o GDNF. No estudo atual, modificaram diferentes pontos do protocolo, principalmente no que diz respeito ao modo de entrega do GDNF. Classificado como um estudo

de fase II, duplo-cego, controlado por placebo (e seguido por uma fase aberta); o grande diferencial foi um sistema inovador de CED para liberação do GDNF de forma intermitente. Além disso, outra peculiaridade diz respeito a condição dos pacientes, todos os selecionados apresentavam DP de grau moderado (H&Y entre 2 – 3) e presença de sintomas motores há menos de 5 anos. A partir desses critérios de seleção, o atual ensaio diferiu de estudos anteriores que também recrutavam pacientes em estágios avançados da doença, considerando o preceito de que em estágios iniciais da DP o estriado ainda apresenta uma maior quantidade de fibras nervosas dopaminérgicas e possibilitaria a resposta ao NTF (WHONE, A. et al., 2019).

O ensaio clínico em questão apresentou basicamente duas fases: (1) fase duplo cego e controlada por placebo; com etapa piloto para avaliação de parâmetros de segurança da técnica cirúrgica e do modo de liberação do NTF (n = 6), concomitante à etapa primária para avaliação da eficácia do tratamento (n = 35); seguida da (2) fase final, um estudo clínico aberto com os 41 pacientes, inicialmente aleatorizados em dois grupos, recebendo exclusivamente GDNF. Apesar das diferentes fases (duplo-cega ou aberta), as características do tratamento se mantiveram em ambas; através de infusões intraputâmen bilaterais e mensais de GDNF em dose total de 120 µg (0,2 µg/µL/hemisfério/mês) ou placebo (excepcionalmente na primeira fase), durante 10 meses (em cada uma das fases). Assim como o modo de condução experimental das duas fases, os resultados obtidos em ambos também se assemelhou. O desfecho para os pacientes tratados com GDNF durante os 10 meses iniciais, foi estatisticamente igual ao dos pacientes do grupo controle (com decréscimos médios de $17,3 \pm 17,6$ e $11,8 \pm 15,8\%$ vs o basal, respectivamente) nas pontuações motoras do estado *off* da UPDRS. Após a segunda etapa do ensaio, com o estudo aberto por mais 10 meses, não foram encontradas novidades em relação ao desfecho primário. Novamente a redução nos escores de incapacidade motora ocorreu de forma semelhante em ambos grupos (cerca de 27% para placebo+GDNF e GDNF+GDNF). Contudo, é importante ressaltar que apesar da ausência de diferenças estatísticas, quando analisado o número total de pacientes com melhoras robustas da função motora (superior a 10 pontos na fase *off* da UPDRS), cerca de 43% dos pacientes do grupo tratado com o GDNF atingiram tais índices. Em contrapartida, nenhum dos pacientes do grupo placebo apresentou tal benefício (todos com escores < 10 pontos na fase *off* da UPDRS). Além disso, somente nos pacientes tratados com o GDNF as análises por PET demonstraram um aumento significativo na captação de DA em todo o putâmen, variando de 25% a 100% dentre os hemisférios e regiões estriatais (essas porcentagens são expressivamente maiores do que as apresentadas por quaisquer um dos estudos clínicos prévios com NTFs na DP). Diante da ausência de resultados

na captação de DA estriatal no grupo controle, discute-se que a melhora observada nos escores motores deste grupo poderia ser explicada, em parte, pela perturbação mecânica da cirurgia para implante de cânulas no putâmen. O microtrauma é conhecido por estimular a liberação de NTFs, como o GDNF e o BDNF e estes poderiam levar ao aumento da sinaptogênese e brotamento axonal em neurônios dopaminérgicos, resultando na melhora motora do grupo placebo. Ademais, nenhum problema de segurança foi identificado (WHONE, A. et al., 2019; WHONE, A. L. et al., 2019).

Em comparação com as doses de GDNF utilizadas em ensaios clínicos anteriores, a aplicada no estudo de Whone e colaboradores (2019) foi substancialmente menor e efeitos mais consistentes poderiam ter sido obtidos com dosagens superiores. Vários estudos pré-clínicos, realizados para determinar e derivar uma dose clínica com segurança, demonstram que tanto a farmacocinética como a farmacodinâmica das infusões de GDNF intraestriatais são dependentes da dose. Em particular, um estudo conduzido no ano de 2013, mostrou que ocorreu um aumento significativo na sinaptogênese estriatal (determinado pelo aumento nos níveis de sinaptofisina) na concentração de 0,2 µg/mL de GDNF, enquanto o brotamento axonal ocorreu somente em uma dose 3 vezes maior, a partir da infusão de 0,6 µg/mL (TAYLOR et al., 2013). A dose utilizada no último ensaio clínico realizado com o GDNF foi reduzida devido à dados de toxicidade publicados a partir de um estudo em primatas não-humanos logo no início do protocolo experimental clínico (mostrando degeneração cerebelar em macacos tratados com doses de 0,67 µg/mL). No entanto, estudos toxicológicos recentes indicaram que essa dose mensal pode ser ampliada em cerca de quatro vezes de maneira segura (LUZ et al., 2018). Assim, o intuito atual de Whone e seus colaboradores em Bristol, é desenvolver um estudo de fase III com inclusão de um esquema terapêutico com escalonamento de dose.

O seguimento dos ensaios clínicos com o GDNF não se limita às expectativas da fase III da equipe de Bristol, bem como a NRTN não se trata mais do único NTF a ser testado na forma de AAV2. Estão sendo desenvolvidos outros ensaios com vetor viral adenoassociado, agora com o GDNF. A abordagem de transferência gênica vem sendo testada para o GDNF em um ensaio clínico de fase I. O estudo iniciou o recrutamento com auxílio do *NIH's National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS) e recentemente teve mudança na sede da pesquisa, atualmente encontra-se centrado na Califórnia. Na atual etapa, 24 indivíduos com DP avançada estão sendo avaliados em um esquema com o escalonamento de doses (9×10^{10} , 3×10^{11} , 9×10^{11} ou 3×10^{12} gv) em testes de segurança e tolerabilidade, sendo o AAV2-GDNF bilateralmente infundido por CED ao putâmen. Apesar de ainda não haverem resultados

publicados dessa abordagem (identificação no ClinicalTrials.gov: NCT01621581), ela não é a única que atualmente aposta na terapia gênica com o GDNF. Em breve, deve se iniciar um estudo de fase II, patrocinado pela empresa Brain Neu Bio em associação a Universidade da Califórnia e de Ohio. O estudo de Fase II adotará mudanças no protocolo, inscrevendo somente pacientes com DP moderada e otimizando a técnica cirúrgica (de maneira que o volume do vetor deve triplicar, segundo resultados ainda não publicados). Espera-se que as mudanças resultem em uma cobertura vetorial de pelo menos 50% do putâmen (excedendo os 26% de cobertura obtidos na fase I – dados apresentados em congresso) (American Association of Neurological Surgeons, 2019; GlobalData's Pharmaceutical Intelligence Center, 2019).

Além disso, tem-se buscado a caracterização de novas moléculas com ação neurotrófica, sejam ligantes dos receptores de NTFs ou ativadores da sua via de síntese e sinalização. O investimento da empresa Genecode é um exemplo disso, a empresa tem apostado no desenvolvimento de pequenas moléculas miméticas à família de ligantes do GDNF. Tais moléculas apresentam potencial de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e ativar a sinalização neurotrófica em neurônios dopaminérgicos. Em um trabalho publicado recentemente, por pesquisadores da Universidade de Helsinque (Finlândia), além do potencial de proteção observado em um modelo animal da DP, foi demonstrado uma boa distribuição e biodisponibilidade de um destes agonistas de GFR α após administração por via oral (MAHATO et al., 2019). Outro alvo de pesquisa têm sido os “*boosters*” inespecíficos de NTFs. Trata-se de agentes farmacológicos e não farmacológicos impulsadores da expressão e atividade de NTFs, como a rasagilina (inibidor seletivo da monoamino oxidase B – MAO-B) e o PYM50028 (Cogane®), ambos com capacidade de regular a expressão de GDNF e BDNF (a citar: um aumento de 297 e 511%, respectivamente, com o PYM50028 em um modelo animal da DP) (VISANJI et al., 2008). Como exemplares protótipos da classe, eles têm sido testados em ensaios clínicos em pacientes com a DP devido seu potencial neuroprotetor/restaurador e capacidade de atravessar a BHE (com a vantagem de administração por via oral). Porém, como mais uma das estratégias terapêuticas baseada em NTFs para a DP, até o momento não houve sucesso na translação da pesquisa pré-clínica para a clínica (RODRIGUES et al., 2014).

Contudo, no final do ano de 2017, foi iniciado um ensaio clínico com um NTF caracterizado 10 anos mais cedo – uma promessa para a terapia da DP advinda de 2007: a descoberta CDNF (do inglês: *cerebral dopaminergic neurotrophic factor*) (LINDHOLM, P. et al., 2007). O CDNF é membro da mais recente família de NTFs, juntamente com o MANF, sendo definidos como NTFs não convencionais devido à pouca similaridade com os NTFs há

tempos caracterizados (como as neurotrofinas ou família dos ligantes do GDNF). As diferenças observadas se referem tanto à parte estrutural, como ao mecanismo de ação pelo qual exercem sua atividade neuroprotetora e neurorestauradora. Ademais, as falhas anteriores dos estudos de fase II com NTFs têm fornecido informações importantes sobre como melhorar a infusão cerebral de proteínas terapêuticas. As características e a localização dos cateteres, assim como o protocolo de infusão e as propriedades de distribuição da proteína, estão entre os principais determinantes no sucesso de terapias baseadas na administração de proteínas intracerebrais. Na execução do protocolo clínico com o CDNF, todos esses pontos de falha anteriormente experimentados têm sido levados em consideração (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

O ensaio clínico com a utilização do CDNF em pacientes parkinsonianos possui financiamento da companhia farmacêutica Herantis Pharma e é conduzido em três centros na Finlândia e Suécia. Neste estudo multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo de fase I - II, 18 pacientes com DP idiopática moderada à avançada ($H\&Y \leq 3$, diagnóstico entre 5 - 15 anos) serão inscritos. Infusões mensais de CDNF em três doses (120, 400 e 1200 μg) serão administradas por 6 meses e em uma segunda fase de extensão todos os pacientes receberão CDNF por mais 6 meses (nas mesmas três doses). A abordagem contará com um sistema de administração implantado cirurgicamente capaz de realizar a infusão intracerebral intermitente (o mesmo utilizado na fase II do estudo de Bristol com o GDNF, desenvolvido pela Renishaw – uma empresa britânica de engenharia) (HUTTUNEN, H.J., 2018). O objetivo primário do estudo é avaliar a segurança e tolerabilidade da administração do CDNF intraputâmen, assegurando a atividade biológica, estabilidade e compatibilidade da proteína recombinante humana com o dispositivo de entrega. Os objetivos secundários incluem a avaliação da escala motora na fase *off* e das atividades da vida diária (UPDRS); além da avaliação da captação de [^{18}F]FE-PE2I pelo transportador de DA no núcleo caudado e putâmen, de forma a se verificar a integridade do sistema nigroestriatal. Ademais, outros importantes pontos finais do estudo referem-se à avaliação dos níveis de CDNF e de α -sinucleína nas formas fosforilada, oligomérica e total – no soro e líquido cefalorraquidiano (e/ou da distribuição no tecido *post-mortem*) (Identificador no *ClinicalTrials.gov*: NCT03295786 e NCT03775538). O término deste ensaio clínico está previsto para setembro de 2020 e até lá, somando o potencial do CDNF em estudos pré-clínicos ao ceticismo envolvido com a transposição de tais evidências para a clínica, espera-se ansiosamente pela resposta da seguinte pergunta: é aqui que a viagem na montanha-russa termina ... ou onde tudo recomeça?

Na **Quadro 1** consta um compilado dos principais ensaios clínicos com NTFs na DP.

Quadro 1: Sumário dos estudos clínicos com NTFs na DP.

NTF	GDNFrh	GDNFrh	GDNFrh	GDNFrh	AAV2-NTRN	AAV2-NTRN	AAV2-NTRN	AAV2-NTRN	GDNFrh	AAV2-GDNF	CDNFrh
Tipo de ensaio	MRDCCP ^d	Aberto	Aberto	MRDCCP	Aberto	MRDCCS	Aberto	MRDCCS	RDCCP ^h	Aberto	MRDCCP*
Fase	I-II	I	I	I-II	I	II	I	II	II	I	I-II
Duração (meses)	6-8+20	12+12	6+6	6	12	12-18	24	15-24	10+10	NA	6+6
Local da infusão	ICV, unilateral	IPu, bilateral	IPu, unilateral	IPu, bilateral	IPu, bilateral	IPu, bilateral	IPu + SN, bilateral	IPu + SN, bilateral	IPu, bilateral	IPu, bilateral	IPu, bilateral
Modo de liberação	Infusão em bolus	Infusão contínua	Infusão contínua / pulsada	Infusão contínua	Infusão única	Infusão única	Infusão única	Infusão única	Infusão em bolus	Infusão única	Infusão em bolus
Dose diária ou mensal/hemisfério (μ g ou μ g)	25-4000 (mensal)	14.4-43.2	3-30	15	1.3×10^{11} ou 5.4×10^{11}	5.4×10^{11}	5.4×10^{11} ou 24.0×10^{11} (IPu) + 4.0×10^{11} (SN)	1.0×10^{12} (IPu) + 2.0×10^{11} (SN)	120 (mensal)	9×10^{10} , 3×10^{11} , 9×10^{11} ou 3×10^{12}	120, 400 e 1200 (mensal)
Esquema de tratamento	Dose constante	Doses crescentes	Doses crescentes	Dose constante	NA	NA	NA	NA	Dose constante	Dose constante	Dose constante
Participantes (n°)	50	5	10	34	12	58	6	51	41	24	18
Idade (anos)	58 ± 8	54.2 ± 6	57.9 ± 9.3	56 ± 7.2	57 ± 8	60.1 ± 7.6	50.3 ± 7.5	59.7 ± 5.5	55.9 ± 8.8	NA	NA
Diagnóstico (anos)	11 ± 6	19 ± 9.8	8.7 ± 3.6	9.7 ± 3.9	11 ± 3.2	9.5 ± 3.4	8.8 ± 3.7	7.8 ± 3.2	8.6 ± 4.4	NA	NA
Benefícios ^a	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Não ^e	NA	Não ^g	Não ⁱ	NA	NA
Efeitos adversos ^b	SL, PP, DC	SL	SL, DC	Pa, DC, IRS	DC	DC, Tu ^f	DC	DC	SL, Pa, <i>on-off</i>	NA	NA
ID do ensaio ^c	NA	NCT00111982	NCT00006488	NCT00115427	NCT00252850	NCT00400634	NCT00985517		NCT03652363	NCT01621581	NCT03295786N CT03775538
Referências	(NUTT et al., 2003)	(GILL, S. S. et al., 2003; PATEL, N. K. et al., 2005)	(SLEVIN et al., 2007; SLEVIN et al., 2005)	(LANG et al., 2006)	(MARKS, W. J., JR. et al., 2008)	(MARKS et al., 2010)	(BARTUS, R. T.; BAUMANN; SIFFERT; et al., 2013)	(WARREN OLANOW et al., 2015)	(WHONE, A. et al., 2019; WHONE, A. L. et al., 2019)	NA	NA

Legenda: rh – recombinante humano; AAV2 – vetor viral adenoassociado 2; MRDCCP – ensaio clínico multicêntrico, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo; RDCCP – ensaio clínico randomizado, duplo-cego, controlado por placebo; ICV – administração intracerebroventricular; IPu – administração intraputâmen; NA – não aplicável ou não avaliado; SL – sinal de Lhermitte; PP – perda de peso; DC – dores de cabeça; Pa – parestesia; IRS – infecção do trato respiratório superior; Tu – tumores. ^a A melhora clínica foi avaliada utilizando a UPDRS. Outros critérios funcionais e não motores, usados em alguns desses estudos, não foram incluídos. ^b Apenas os efeitos adversos mais prevalentes e persistentes estão listados. ^c Fonte: <http://www.clinicaltrials.gov>. ^d Este MRDCCP foi seguido por um ensaio aberto em 16 pacientes com DP que receberam até 4 mg de GDNF por mais 20 meses, nenhuma melhora foi observada. ^e Uma melhora modesta do tratamento com AAV2-NRTN foi observada após 18 meses em um subgrupo de pacientes que tiveram avaliações duplo-cegas após 12 meses. ^f Três pacientes tratados com AAV2-NRTN e dois controles desenvolveram tumores; acredita-se que os tumores no grupo AAV2-NRTN não tenha sido ocasionada pela infusão do NTF. ^g Após assegurar-se da segurança do tratamento em uma fase aberta, este ensaio demonstrou efeito do tratamento em um subgrupo de pacientes com DP diagnosticada ≤ 5 anos. ^h Este RDCCP foi seguido por um ensaio aberto onde todos os pacientes receberam GDNF (na mesma dose) por mais 10 meses, nenhuma melhora foi observada. ⁱ Apesar da ausência de efeitos significativos: somente os pacientes tratados com o NTF apresentaram melhoras ≥ 10 na escala motora da UPDRS; e aumento da captação de dopamina.

2.2.2 Fator neurotrófico de dopamina cerebral (CDNF)

Nos últimos 25 anos, cerca de três dúzias de relatórios clínicos foram publicados sobre a segurança e a eficácia de NTFs em pacientes com doenças neurodegenerativas. Estes números são reflexo de ensaios com diferentes NTFs; diferentes formas de entrega e liberação; diferentes doenças neurodegenerativas (esclerose lateral amiotrófica, DA e DP); dentre outras variáveis. Todavia, a exemplo da pesquisa clínica com NTFs na DP, nenhum desses trabalhos forneceu subsídios suficientes para introdução de NTFs como tratamento de doenças neurodegenerativas. Na DP em especial, a fatídica saga do GDNF e da NRTN em pesquisas clínicas – das expectativas iniciais às limitações posteriores – desencadeou certo ceticismo envolvendo a terapia com NTFs (BARTUS, R. T.; JOHNSON, 2017a;2017b). Contudo, desde a descoberta do CDFN em 2007 e o início de seu primeiro ensaio clínico em 2017, as expectativas têm se renovado. Isso porque, o CDFN possui características estruturais (**Figura 7**) e mecânicas (**Figura 8**) que o difere das demais famílias de NTFs (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

2.2.2.1 Implicações mecanicistas da estrutura proteica do CDFN

O CDFN é uma proteína que difere estruturalmente da maioria dos NTFs, a exceção trata-se do MANF, um NTF descoberto poucos anos antes do CDFN (PETROVA et al., 2003). Apesar de compartilharem apenas cerca de 60% de homologia na sua sequência de aminoácidos, ambos têm alta semelhança na sua estrutura tridimensional e na forma como desempenham sua atividade. Justamente devido as suas particularidades, o CDFN juntamente com o MANF, tornaram-se uma nova família de NTFs (LINDAHL; SAARMA; LINDHOLM, 2017). Assim, enquanto o GDNF e a NRTN possuem estruturas semelhantes e típica da maioria dos NTFs, com características moleculares que limitam sua distribuição cerebral após infusão intraparenquimatosa; as propriedades biofísicas do CDFN lhe conferem ampla difusão entre os tecidos, diferentes possibilidades de interação e, conseqüentemente, de ação (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

O CDFN é uma proteína altamente conservada na evolução de *C. elegans* para o homem e amplamente expressa em muitos tecidos de invertebrados e vertebrados (LINDHOLM et al., 2008; PALGI et al., 2009). No cérebro de roedores, foram detectados transcritos do CDFN em estágios da vida embrionário, pós-natal e adulta, incluindo o estriado e a SN; além da presença em tecidos não encefálicos. Em consonância, foram encontrados altos níveis de

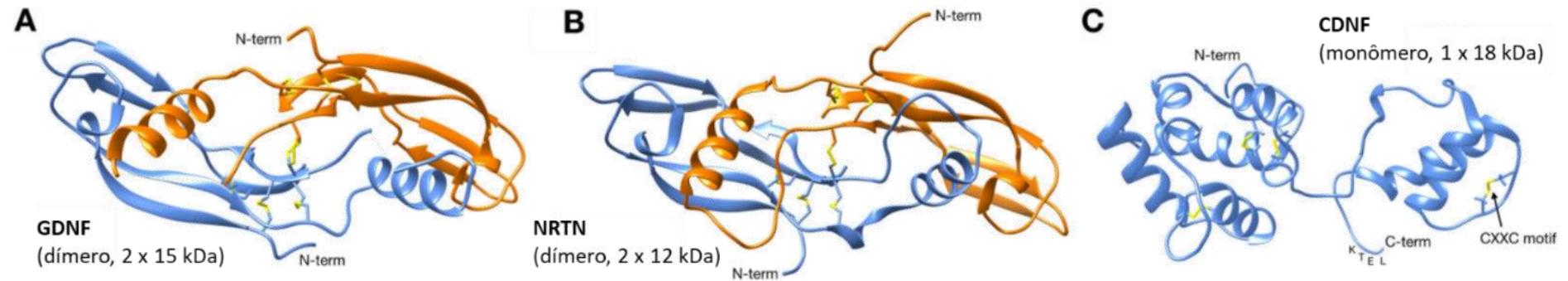
RNA_m para o CDNF no cérebro humano e tecidos não neuronais. Inclusive, uma grande expressão de transcritos do CDNF foi observada em tecidos desprovidos de corpos celulares, contendo principalmente projeções axonais e oligodendrócitos. Além disso, níveis detectáveis do CDNF são encontrados também no soro humano (LINDHOLM, P. et al., 2007).

A estrutura proteica primária do CDNF é caracterizada por uma unidade monomérica pequena, com um peso molecular de aproximadamente 18,5 kDa (proteína madura com 161 aminoácidos) (LINDHOLM, PÄIVI et al., 2007). Neste arranjo de aminoácidos, o CDNF possui um peptídeo sinal N-terminal que tem a capacidade de direcioná-lo para o retículo endoplasmático (RE). Bem como, possui um sinal de retenção ao RE em seu domínio C-terminal, KDEL (configurado pela seguinte sequência de aminoácidos: Lis–Asp–Glu–Leu ou K-D-E-L, conforme denominação da IUPAC, do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*), este domínio C-terminal destinado à secreção normalmente é ausente em NTFs, como o GDNF ou a NRTN. Assim, o CDNF se acumula no lúmen do RE de células saudáveis e o desligamento do seu sinal de retenção ao RE na cauda C-terminal resulta em sua liberação (LIU et al., 2015).

Os dois domínios do CDNF, N e C-terminal, configuram a estrutura tridimensional proteica a partir de conformações independentes, conectadas por uma região flexível de *loop*. A estrutura secundária do CDNF é predominantemente helicoidal, com cinco α -hélices no domínio N-terminal e três α -hélices no domínio C-terminal. Três pontes dissulfeto estabilizam o domínio N-terminal, enquanto a sequência CRAC do CDNF humano (Cis-Arg-Ala-Cis) no domínio C-terminal forma uma ponte dissulfeto interna. Esta ponte dissulfeto CXXC (que possui variação nos aminoácidos intermediários) encontrada no CDNF é semelhante ao motivo CXXC encontrado nas oxidoredutases (enzimas que catalisam reações de redução-oxidação - redox) e dissulfeto isomerases (chaperonas redox responsáveis pela inserção correta das ligações dissulfeto em proteínas do RE). Contudo, a análise do motivo CXXC presente no CDNF (e também no MANF), não demonstra evidências de atividade redox, apesar de mostrar que o motivo CXXC é essencial para a atividade neuroprotetora (do MANF e, provavelmente do CDNF dada suas semelhanças estruturais e funcionais) (HUTTUNEN; SAARMA, 2019). Além disso, o CDNF possui dois locais potenciais para N-glicosilação; contudo, a glicosilação não parece ser necessária para a sua atividade neuroprotetora (SUN et al., 2011).

Na **Figura 7** é ilustrada a representação da estrutura do GDNF, da NRTN e do CDNF, mostrando as diferenças estruturais dos três NTFs mais estudados no contexto da DP.

Figura 7: Estrutura dos NTFs utilizados em ensaios clínicos em pacientes com a DP.



Legenda: A figura ilustra a estrutura quaternária dos três NTFs mais estudados na DP. (A) Estrutura do GDNF e da (B) NRTN, ambos dímeros de aproximadamente 30 e 24 kDa, respectivamente, estrutura secundária predominantemente em folha- β e dois domínios N-terminal; (C) Estrutura do CDNF, um monômero, composto apenas de α -hélices, um motivo CXXC, dois domínios distintos, um N-terminal e outro C-terminal com uma sequência de retenção (KDEL). Modificado de HUTTUNEN; SAARMA, 2019.

2.2.2.2 RE e o mecanismo de ação do CDNF

Os NTFs convencionais, de maneira geral, exercem seus efeitos ligando-se a receptores que possuem domínios de ligação na membrana plasmática das células-alvo. Para o GDNF e a NRTN, por exemplo, na superfície celular das células-alvo forma-se um complexo de sinalização, composto por um dímero específico de um dos NTFs ligado a um co-receptor da família $GFR\alpha$ presente na membrana, e a molécula receptora do tipo tirosina cinase RET citosólica. De maneira que, após a formação inicial do complexo NTF- $GFR\alpha$, as duas moléculas RET se unem, desencadeando trans-autofosforilação de resíduos específicos de tirosina no domínio cinase de cada uma das moléculas de RET. A fosforilação das tirosinas inicia então os processos de transdução de sinal intracelular. Da perspectiva mecanicista, o GDNF e a NRTN ativam as mesmas vias de sinalização, envolvendo a ativação de RET e, subsequentemente, as cascatas de sinalização PI3K-Akt (fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase B) e RAS-MAP cinase (do inglês: *rat sarcoma virus*/proteína ativada por mitógeno cinase). Dessa forma, promovem o crescimento de neuritos, a regeneração axonal e a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos saudáveis e lesionados (AIRAKSINEN; SAARMA, 2002).

Diferentemente dos NTFs clássicos, o CDNF exerce sua atividade somente mediante a fatores celulares estressores, uma vez que não há evidências de efeito do CDNF em cultura de neurônios saudáveis (LINDHOLM, P. et al., 2007). Em contrapartida, o CDNF demonstrou um potente efeito neuroprotetor e neurorestaurador quando em cultura de neurônios mesencefálicos ou ao tecido cerebral de animais que receberam a administração de toxinas dopaminérgicas (HUTTUNEN; SAARMA, 2019). A partir da infusão intraestriatal, já foi demonstrado que o CDNF é internalizado por neurônios corticais e estriatais, principalmente neurônios dopaminérgicos, sendo transportado retrogradamente para a SN (MÄTLIK et al., 2017). Há indícios também que após infusão intraparenquimatosa, o CDNF se localize em endossomos e corpos multivesiculares dos neurônios. Todavia, permanece desconhecido o mecanismo pelo qual o CDNF é internalizado e transportado para ao RE (VOUTILAINEN, MERJA H. et al., 2011).

Apesar dos esforços desempenhados até o momento, o CDNF não possui um receptor de superfície celular identificado que possa estar relacionado ao seu mecanismo de ação. Recentemente, sugeriu-se que os receptores para KDEL poderiam ser translocados do RE, em situações de estresse, e estabelecer a ligação do NTF à superfície celular. Além disso, especula-se que interações lipídicas com a superfície celular possam mediar a interação inicial e posterior

internalização do CDFN. A estrutura do CDFN, em seu domínio N-terminal, tem uma arquitetura globular típica de proteínas saposinas, caracterizadas como proteínas ricas em cisteína e capacidade de interagir com lipídios e membranas (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

Contudo, considerando a localização preferencial do CDFN no lúmen do RE, de onde é regulada sua secreção endógena, supõe-se que seu mecanismo de ação principal deva estar envolvido com a modulação da função do RE. Especialmente, em um sistema de sinalização celular homeostática particularmente importante no RE, a via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês: *Unfolded Protein Response*), onde o CDFN agiria como regulador autócrino e parácrino da UPR em resposta ao estresse do RE (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

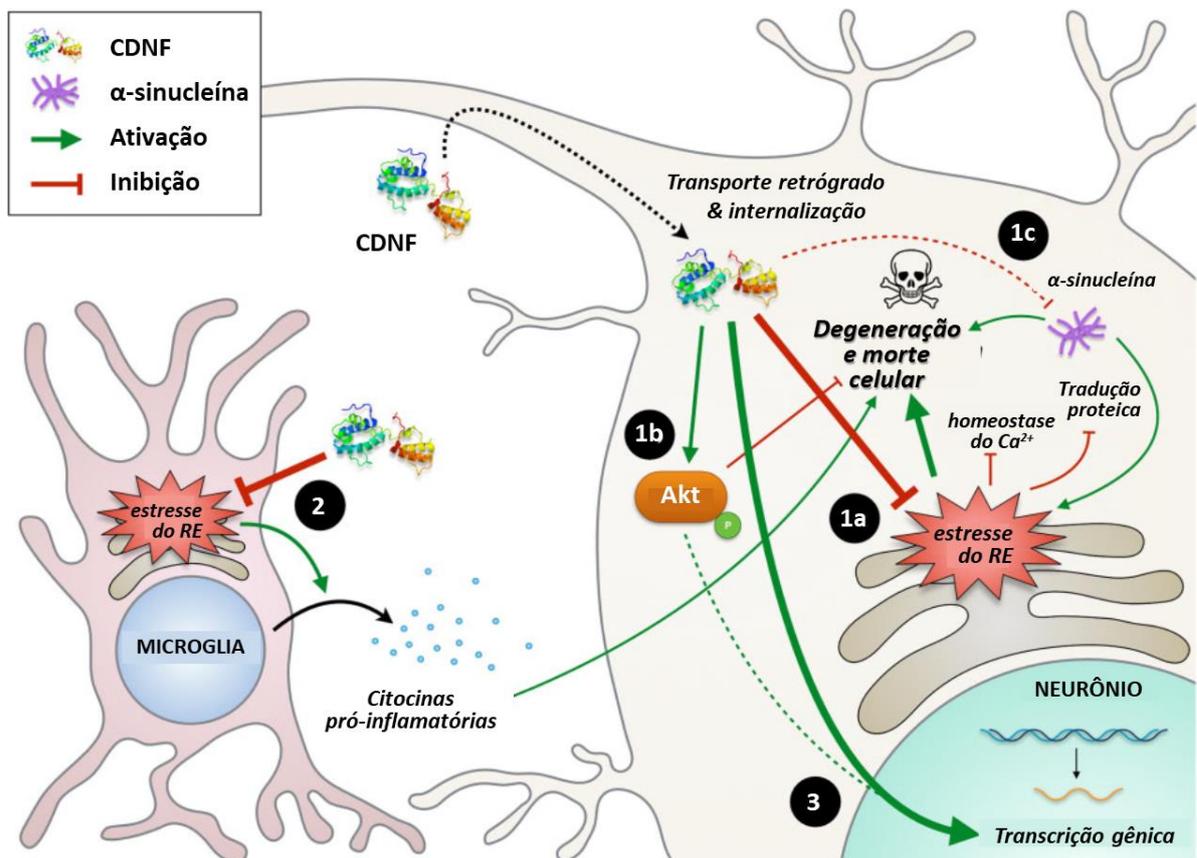
O RE é uma organela extremamente sensível ao estresse celular causado pela disfunção proteica, a UPR serve como uma sinalização dinâmica e adaptativa no RE ajudando a restaurar a homeostase celular. Na DP, existem evidências de que proteínas envolvidas com a ativação do sistema UPR encontram-se anormalmente fosforiladas no tecido *post-mortem* de pacientes e colocalizadas com inclusões de α -sinucleína em neurônios dopaminérgicos da SNC (HOOZEMANS et al., 2007). Os três principais eixos de sinalização à UPR são acionados por ativação da PERK (proteína cinase do RE), ativação do ATF6 (fator de transcrição-6) e ativação da IRE1 α (enzima requerente de inositol-1 α), todas localizadas na membrana do RE. Como o estresse do RE atenua a tradução geral de proteínas (especialmente via PERK-eIF2 α), é provável que as sinapses sejam muito sensíveis ao estresse prolongado do RE. Formas duradouras de plasticidade sináptica são altamente dependentes da síntese de novas proteínas e dessa forma, tem sido crescente o número de evidências sugerindo a importância da UPR e da proteostase desempenhada pelo RE. Por vez, o estresse prolongado ou severo do RE pode desencadear a morte celular através de mecanismos pró-apoptóticos da UPR (HETZ; CHEVET; OAKES, 2015). Como consequência, a célula ativa vias de sinalização para aumentar a transcrição de proteínas envolvidas com o enovelamento proteico e a sobrevivência (via Akt, por exemplo), de modo a exercer uma resposta compensatória citoprotetora. A citar, nesse cenário, quando comparado o potencial do CDFN e do GDNF em um modelo animal da DP, ambos os NTFs ativaram a sobrevivência neuronal via sinalização PI3K-Akt, todavia apenas o CDFN diminuiu os níveis de marcadores do estresse do RE (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

Ademais, os efeitos neuroprotetores e neurorestauradores do CDFN parecem estar relacionados às ações: sobre vias apoptóticas; anti-inflamatórias; de regulação do complexo I mitocondrial e estresse oxidativo; além de uma atividade sobre o potencial de agregação da α -sinucleína. O CDFN apresentou efeitos positivos *in vitro* e *in vivo* em um modelo da DP de

superexpressão da α -sinucleína, divergindo do GDNF, reconhecidamente ineficaz na proteção contra a agregação da α -sinucleína (LATGE, C. et al., 2015).

Apesar deste grande avanço do conhecimento acerca do potencial terapêutico do CDNF na DP, os mecanismos moleculares precisos de ação do CDNF, inclusive identificação de receptor, não estão claramente definidos. Coletivamente, as ações pleiotrópicas do CDNF são determinantes para classifica-lo como um NTF não convencional e com grande potencial na DP. Na **Figura 8** são apresentados os mecanismos e vias de sinalização reguladas pelo CDNF (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

Figura 8: Representação esquemática da sequência de eventos envolvidos com o mecanismo de ação do CDNF.



Legenda: O CDNF protege e restaura a funcionalidade de neurônios sob estresse do retículo endoplasmático (RE) por múltiplos mecanismos: No neurônio (1a) o CDNF inibe o estresse crônico do RE através da modulação das vias de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR). A inibição global da tradução proteica e alterações na homeostase do Ca^{2+} , estão entre as consequências do estresse prolongado do RE, ambos conhecidos por prejudicar a função sináptica. Ao modular a sinalização da via UPR e as respostas adaptativas, o CDNF reduz a morte celular e melhora a funcionalidade neuronal; (1b) o CDNF promove a ativação da proteína quinase B (Akt), apoiando a sobrevivência neuronal; e, ainda, (1c) interfere na oligomerização da α -sinucleína, reduzindo sua toxicidade. Em células microgliais (2) o estresse crônico do RE promove neuroinflamação que exacerba a disfunção neuronal, o CDNF inibe a neuroinflamação reduzindo a síntese e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Por fim, (3) o CDNF administrado exogenamente, apresenta efeitos a longo prazo no cérebro, mediados pela regulação da transcrição de determinado conjunto de genes. CDNF: fator neurotrófico de dopamina cerebral; Akt: proteína quinase B; RE: retículo endoplasmático. Adaptado de HUTTUNEN; SAARMA, 2019.

2.2.2.3 Estudos pré-clínicos com o CDNF na DP

Enquanto os mecanismos exatos não estão elucidados, diversos estudos demonstram o potencial do CDNF em modelos *in vitro* e *in vivo* da DP. Um estudo de revisão da literatura foi realizado no site PubMed Central®, com as seguintes chaves de busca: “*CDNF*” e “*cerebral dopamine neurotrophic factor*” (o tempo de atualização máximo da pesquisa foi determinado até o mês de dezembro do ano de 2019). De acordo com seu escopo, esses artigos foram alocados em 6 diferentes classes de manuscritos e anos de publicação. Como resultado geral, foram encontrados 83 trabalhos, entre artigos originais e de revisão sobre o CDNF, além disso é evidente o crescimento no número de publicações totais com o tema nos últimos anos (**APÊNDICE I**). Posteriormente, há a apresentação de cada um dos trabalhos que utiliza o CDNF em algum dos modelos da DP, animal ou em cultura celular (**Quadro 2**).

Dentre esses mais de 80 artigos publicados em revistas científicas desde 2007, especificamente, 17 trabalhos trataram de avaliar o potencial do CDNF em modelos da DP (dentre trabalhos relacionados à DP sem a utilização de modelos propriamente; focados no potencial trófico do CDNF em outras doenças que não a DP; focados na sua relação estrutural-atividade; artigos de revisão; e outros – que apareceram com as palavras-chave de busca, mas não tratavam necessariamente do CDNF como NTF). Dentre os 17 trabalhos atualmente existentes com a avaliação do CDNF em modelos da DP, pode-se observar muitas variações metodológicas, como: uso de diferentes espécies animais (ratos, camundongos, primatas não-humanos, além de cultura celulares); diferentes estratégias de administração do CDNF (intervenções objetivando proteger e/ou restaurar, doses, vias de administração, mecanismos de entrega e liberação do NTF); diferentes modelos de lesão aos neurônios dopaminérgicos (6-OHDA, MPTP, MPP⁺ e superexpressão de α -sinucleína; bem como locais de administração da toxina, estriado, SN ou MFB – do inglês, *medial forebrain bundle*); e diferentes desfechos primários e secundários (testes para avaliação motora, análise dos mecanismos de morte e extensão da neurodegeneração). Sobretudo, como exposto no **Quadro 2**, a grande maioria dos estudos demonstrou o potencial do CDNF em proteger e restaurar neurônios dopaminérgicos da degeneração em modelos experimentais da DP (dados obtidos a partir da revisão da literatura).

Quadro 2: Estudos investigando os efeitos do CDNF em modelos experimentais da DP.

Intervenção	Modelo da DP	Teste comportamental	Avaliação neuroquímica
<p>Administração de CDNF ou GDNF 10 µg, intraestriatal, unilateral, antes (6 h) e após a lesão (4 semanas) (LINDHOLM, P. et al., 2007)</p>	<p>6-OHDA 8 e 20 µg; protocolo de proteção e restauração, respectivamente; intraestriatal, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com anfetamina</u> Efeito protetor, 2 e 4 semanas após a lesão. Efeito restaurador, 12 semanas após a lesão. *Efeito semelhante ao GDNF.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neuroproteção na SNc e estriado, 4 semanas após a lesão. Neurorestauração parcial na SNpc, 12 semanas após a lesão. *Efeito semelhante ao GDNF.</p>
<p>Administração crônica de CDNF, MANF ou GDNF (com bomba osmótica) 3 µg/24 h (dose com efeito) por 14 dias, canulação intraestriatal, unilateral, 2 semanas após a lesão. (VOUTILAINEN, M. H. et al., 2011)</p>	<p>6-OHDA 2 injeções de 10 µg, intraestriatal, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com anfetamina</u> Efeito restaurador cumulativo (2, 4, 6, 8 e 10 semanas após a lesão avaliadas conjuntamente). *MANF e GDNF não apresentaram efeitos significativos.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração na SNc e estriado, 10 semanas após a lesão. *MANF e GDNF não apresentaram efeitos significativos.</p>
<p>Administração de CDNF em camundongos 10 µg, intraestriatal, bilateral, antes (20 h) e após lesão (1 semana). (AIRAVAARA et al., 2012)</p>	<p>MPTP 4 × 15 e 20 mg/kg (protocolo de proteção e restauração, respectivamente), intraperitoneal.</p>	<p><u>Atividade locomotora (avaliada durante 24 h)</u> Efeito protetor e restaurador com aumento da atividade horizontal e vertical, 2 semanas e 24 h após CDNF, respectivamente.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neuroproteção e neurorestauração na SNc e estriado, 2 semanas e 24 h após CDNF, respectivamente. <u>Western blotting/HPLC</u> Sem efeito protetor sob a redução de TH, DAT, DA no estriado, 2 semanas após CDNF.</p>
<p>Administração do vetor viral AAV2-CDNF 2×10⁸ e 1×10⁹ v.g. (doses com efeito), intraestriatal, unilateral, 2 semanas antes da lesão (BACK et al., 2013)</p>	<p>6-OHDA 2 injeções de 10 µg, intraestriatal, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com anfetamina</u> Efeito protetor nas seguintes situações: 2×10⁸ v.g. (2 e 4 semanas após a lesão), 1×10⁹ v.g. (6 e 10 semanas após a lesão). Avaliação 2, 4, 6, 8 e 10 semanas após a lesão.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neuroproteção no estriado e na SNpc, apenas em secções centrais; Co-localização de CDNF e NeuN no estriado e CDNF e TH na SNpc; para ambas as doses, 10 semanas após a lesão.</p>
<p>Administração do vetor viral AAV2-CDNF 4×10¹¹ v.g. intraestriatal, unilateral, 6 semanas após a lesão. (REN, XINMIAO et al., 2013)</p>	<p>6-OHDA 18 µg, intraestriatal, unilateral.</p>	<p><u>Atividade locomotora (avaliada durante 30 min)</u> Efeito restaurador com aumento da atividade horizontal: 14 semanas após a lesão. <u>Rotação com anfetamina</u> Efeito restaurador: 8, 10, 12, 14, 22, 30 e 60 semanas após a lesão.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração na SNc e estriado, 12 semanas após lesão. <u>Western blotting</u> Aumento do imunoc conteúdo de TH e DAT no estriado e de TH na SNpc, 14 semanas após lesão.</p>

Intervenção	Modelo da DP	Teste comportamental	Avaliação neuroquímica
<p>Administração de CDNF em cultura de células PC12 50, 100 ou 200 nM, antes (60 min) e após 6-OHDA (24 h), (com CDNF sendo mantido por mais 24 h na cultura). (MEI, J. M.; NIU, 2014)</p>	<p>6-OHDA 100 uM, durante 24 h.</p>	n.a.	<p><u>Ensaio de viabilidade celular – MTT</u> Citoproteção e Cito restauração. <u>qRT-PCR e Western blotting</u> Aumento da expressão e níveis de Bcl-2 e redução dos níveis de Bax e caspase-3, observados em ambos os protocolos: proteção/restauração. *Os efeitos observados ocorreram de maneira dose dependente.</p>
<p>Administração de carreador plasmidial de CDNF, p3-NBRE-CDNFh 88 ng/mL, (administrados 3 µL), intranigral, unilateral, 2 semanas após a lesão. (NADELLA et al., 2014a)</p>	<p>6-OHDA 20 µg, intraestriatal, unilateral</p>	n.a.	<p><u>Imunofluorescência</u> Aumento da imunomarcagem para CDNF em células da glia da SNc (NG2, GFAP) (efeito semelhante ao da lesão); Redução da ativação astrocitária na SNpc (NG2, GFAP e OX42); Redução do estresse oxidativo na SNc <u>ELISA</u> Sem alterações na expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNFα, IL-1β, IL-6 na SNpc e no estriado vs. aumento pela lesão; 4 semanas após a lesão.</p>
<p>Administração de CDNF transfectado em células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea (MSCs) 2\times10⁵ cel/µL, intravenoso (jugular), intraestriatal e intraestriatal, 1 semana após a lesão. (JIAMING, M.; NIU, C., 2015)</p>	<p>6-OHDA 20 µg, intraestriatal, unilateral</p>	<p><u>Rotação com apomorfina</u> Efeito restaurador, 2, 4 e 6 semanas após a lesão, *Observado apenas para a administração intraestriatal.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração na SNc e estriado, 6 semanas após a lesão, *Observado para a administração intraestriatal e intraventricular.</p>
<p>Administração de lentivírus para superexpressão de CDNF, MANF, GDNF ou CDNF+MANF 3\times10⁸, 8\times10⁸, 4\times10⁸, 6\times10⁸ tu/mL, respectivamente intraestriatal ou intranigral, unilateral, (CDNF+MANF, apenas intranigral), administrados no mesmo dia da lesão. (CORDERO-LLANA, Ó. et al., 2015)</p>	<p>6-OHDA 2 injeções de 10 µg, intraestriatal, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com apomorfina</u> Sem efeito significativo para injeção intraestriatal; Efeito do GDNF para a injeção intranigral; <u>Rotação com anfetamina</u> Efeito apenas do GDNF para a injeção intraestriatal; Efeito do CDNF e de CDNF+MANF para a injeção intranigral; 8 semanas após a lesão.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Para a administração intraestriatal: Neuroproteção na SNc e estriado com GDNF. Para a administração intranigral: Neuroproteção na SNc e estriado com CDNF+MANF; apenas na SNc: MANF ou GDNF; apenas no estriado: CDNF; 8 semanas após a lesão.</p>
<p>Administração de CDNF transfectado em células estromais da medula óssea (BMSCs) intraestriatal, unilateral, 1 semana após a lesão. (MEI, J.; NIU, 2015a)</p>	<p>6-OHDA 20 µg, intraestriatal, unilateral</p>	<p><u>Rotação com apomorfina</u> Efeito restaurador, 2, 4 e 6 semanas após a lesão. *em menor proporção: efeito restaurador <i>per se</i> das BMSCs.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração na SNc e estriado, 6 semanas após a lesão, *em menor proporção: efeito neurorestaurador <i>per se</i> das BMSCs.</p>

Intervenção	Modelo da DP	Teste comportamental	Avaliação neuroquímica
<p>Administração de CDNF em cultura de células do tipo PC12 50, 100 ou 200 nM, antes (30 min) e após 6-OHDA (24 h) (com CDNF sendo mantido por mais 24 h na cultura). (MEI, J.; NIU, 2015b)</p>	<p>6-OHDA 100 uM, durante 24 h.</p>	n.a.	<p><u>Ensaio de viabilidade celular</u> Citoproteção e Citorestauração. <u>TUNEL e Citometria de fluxo</u> Redução da morte celular por apoptose Citoproteção e citorestauração. *Os efeitos observados ocorreram de maneira dose dependente.</p>
<p>Administração de CDNF em cultura de neurônios dopaminérgicos, cultura de células N2a diferenciadas e uso da cultura de A30P (superexpressão α-sin) 10 μM, antes (60 min) da α-sinucleína ou 6-OHDA. (LATGE, CRISTIANE et al., 2015)</p>	<p>Oligômeros de α-sinucleína e 6-OHDA 10 uM, durante 24 h.</p>	n.a.	<p><u>Ensaio de viabilidade celular:</u> Citoproteção nas três abordagens utilizadas – reduziu a morte celular causada pela α-sinucleína (do oligômero, em neurônio dopaminérgico e N2a diferenciado e da superexpressão da forma fibrilar); Protegeu neurônios dopaminérgicos da 6-OHDA.</p>
<p>Administração de CDNF e GDNF em macacos (<i>Callithrix jacchus</i>) 2 injeções de 10 μg, núcleo caudado, unilateral, 3 semanas após a lesão. (GAREA-RODRIGUEZ et al., 2016)</p>	<p>6-OHDA 6 injeções de 5,8 μg, núcleo caudado, unilateral.</p>	<p><u>Condição geral</u> Sem efeito (sobre o peso, consumo sólido e líquido, excreção e aspecto da pele); <u>Estado neurológico / avaliação comportamental observacional</u> Sem efeito (sobre o reflexo sensitivo de membro, lateralidade, atividade locomotora, reflexo pupilar, rastreamento ocular, atenção, marcha e tremor).</p>	<p><u>DAT Scan</u> CDNF restabeleceu a capacidade de ligação ao DAT no estriado, 10 semanas após a lesão. <u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração no estriado com o GDNF. *SN não apresentou degeneração; *sem diferença para DAT estriatal; 12 semanas após a lesão.</p>
<p>Administração de CDNF e GDNF isolados ou em associação 2.5 μg CDNF; 1 μg GDNF; 2.5 μg CDNF + 1 μg GDNF intraestriatal, unilateral, 4 semanas após a lesão (VOUTILAINEN, MERJA H. et al., 2017)</p>	<p>6-OHDA 20 μg, intraestriatal, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com anfetamina</u> Efeito restaurador: 1 μg GDNF; 2.5 μg CDNF + 1 μg GDNF 12 semanas após a lesão. *CDNF sem associação não apresentou efeitos significativos.</p>	<p><u>Western blotting</u> Ambos NTFs aumentaram PI3K-Akt; CDNF diminuiu marcadores de estresse de do RE (ATF6 e GRP78) e a fosforilação do fator eIF2 – no estriado; sem alterações em TH e DAT na SNc e estriado; 4 semanas após a lesão. <u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração na SNc da associação; *estriado não apresentou diferenças; 12 semanas após a lesão.</p>

Intervenção	Modelo da DP	Teste comportamental	Avaliação neuroquímica
<p>Administração do vetor viral AAV8-CDNF, AAV8-DDC isolados ou em associação 2.8 e 2.2×10¹³ v.g. (2 µL), intraestriatal, unilateral, 2 e 5 semanas após a lesão; (AAV8-DDC apenas 5 semanas após). (WANG, L. et al., 2017)</p>	<p>6-OHDA 4 µg, MFB, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com anfetamina</u> Efeito restaurador cumulativo do AAV8-CDNF. Efeito restaurador cumulativo da associação (1, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 semanas após a lesão avaliadas conjuntamente) *O tratamento após 2 semanas apresentou efeitos mais robustos que após 5 semanas da lesão. *AAV8-DDC sem associação não apresentou efeitos significativos.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Neurorestauração na SNpc e estriado do AAV8-CDNF e da associação; 17 semanas após a lesão. *O tratamento após 2 semanas apresentou efeitos > após 5 semanas da lesão. <u>HPLC</u> Aumento de DA no estriado com o AAV8-CDNF e com a associação (administrados 5 semanas após lesão); 17 semanas após a lesão.</p>
<p>Administração de CDFN, GDNF e associação com estimulação cerebral profunda – STN HFS 1, 3.3, 10, 33 e 100 µg de CDFN e 10 ou 100 µg de GDNF, ambos na SNc, 1 ou 4 semanas após a lesão; 10 µg de CDFN + STN HFS, 1 semana após a lesão. (HUOTARINEN, A. et al., 2018)</p>	<p>6-OHDA 10 µg, MFB, unilateral.</p>	<p><u>Rotação com anfetamina</u> Efeito restaurador cumulativo com 10 µg de CDFN e 100 µg de GDNF, quando administrados 4 semanas após a lesão; (2, 4, 6, 8, 12 e 16 semanas após a lesão) Efeito restaurador da associação, 4 semanas após a lesão. <u>Teste do cilindro e discinesias</u> Associação aumenta os toques no cilindro, 2-3 semanas após a lesão – sem alterar as discinesias, por 8 semanas após a lesão.</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> Ausência de efeito neurorestaurador na SNpc e no estriado para o CDFN ou GDNF isolados, 9 e 16 semanas após a lesão; Neurorestauração no estriado com a associação, 8 semanas após a lesão. <u>HPLC (associação)</u> Não houveram modificações na SNc e no estriado nos níveis de DA e DOPAC, 4 semanas após a lesão.</p>
<p>Administração de CDFN na zona subventricular (SZV) 10 µg de CDFN, 2 semanas após a lesão. (NASROLAHI et al., 2019)</p>	<p>6-OHDA 10 µg, intraestriatal, unilateral, desipramina i.p.</p>	<p><u>Teste da caminhada em barra</u> Efeito restaurador do CDFN após 14 e 21 dias de sua administração, com redução da acinesia e bradicinesia. <u>Teste de catalepsia na barra</u> Efeito restaurador do CDFN no tempo de 21 dias após sua administração, com redução da catalepsia (tempo de imobilidade).</p>	<p><u>Imunohistoquímica</u> CDNF aumentou a proliferação, sobrevivência e migração de células-tronco e progenitoras neurais em todos os tempos avaliados após a administração do NTF (7, 14 e 21 dias). Efeito visualizado pela marcação de BrdU/DCX na SZV e no estriado.</p>

2.2.3 Desafios da terapia baseada no uso de NTFs na DP

A partir da revisão apresentada até aqui, apesar das grandes expectativas, até o presente momento a terapia baseada em NTFs não resultou em um desfecho totalmente satisfatório para o tratamento de indivíduos com a DP. Conquanto, muito além das características peculiares de cada um dos NTFs testados, as razões por trás dessa falta de sucesso podem ainda ser resultado de falhas na condução dos ensaios para o desenvolvimento da terapia (RODRIGO et al., 2018).

Artigos de revisão que discutem o tema, indicam que inúmeros fatores podem ser considerados como possíveis motivos do insucesso da translação dos dados pré-clínicos para a pesquisa clínica, a citar: (1) embasamento em estudos pré-clínicos que não consideram as características anatomopatológicas da DP em humanos; (2) extrapolação inadequada da dose utilizada em trabalhos pré-clínicos, desconsiderando-se questões de peso e tamanho da estrutura alvo; (3) desconsiderar o efeito da associação com a terapia padrão; (4) seleção inadequada de pacientes ou não-estratificação em subgrupos de acordo com os diferentes fenótipos da doença; (5) ausência de biomarcadores para diagnóstico precoce; (6) efeito placebo experimentado por pacientes com DP; (7) dificuldade nos sistemas de liberação e administração dos NTFs; (8) grau de invasibilidade do procedimento cirúrgico; (9) produção endógena de anticorpos neutralizantes para a proteína administrada; (10) momento da intervenção com o NTF; (11) determinação incorreta dos desfechos primários e secundários do estudo; (12) avaliação sintomática a partir de escalas e testes insensíveis à totalidade dos benefícios resultantes; (13) curto período de avaliação dos efeitos e/ou (14) análise estatística inadequada (LANG, A. E.; ESPAY, A. J., 2018; RODRIGO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2014).

Sobretudo, o principal desafio encontrado na pesquisa clínica com NTFs tem sido encontrar a melhor maneira de garantir o suprimento trófico; seja em como atingir as concentrações terapêuticas, ou em como realizar a entrega para a região cerebral de interesse. Enquanto a BHE restringe o acesso de macromoléculas da periferia ao SNC, tem sido necessário administrar os NTFs através de cânulas implantadas diretamente na estrutura cerebral alvo. Em última instância, muito embora tais métodos de administração intracerebral provem ser clinicamente válidos e sem efeitos adversos graves, antevê-se que uma grande maioria de pacientes não seria candidato à cirurgia, dada a complexidade e o grau de invasibilidade do procedimento. Assim, uma estratégia não-invasiva para obter NTFs em níveis terapêuticos e de forma segura torna-se essencial (RODRIGO et al., 2018). Neste contexto, a ideia de utilização da via de administração intranasal surge como uma estratégia promissora.

2.2.3.1 Via de administração intranasal no contexto da DP

A cavidade nasal está diretamente ligada ao SNC e as substâncias administradas por essa via não sofrem ação do metabolismo hepático e não requerem atravessar a BHE para atingir o SNC. Trata-se de uma região de contato inicial entre as substâncias químicas e estruturas do SNC. O transporte de substâncias da via intranasal (i.n.) para o SNC é feito através de nervos, vasos sanguíneos, fluido cerebrospinal e o sistema linfático, que contornam os obstáculos impostos pela BHE (BANKS, 2016). Por conseguinte, a via de administração de substâncias pela via i.n. é um método confiável e útil para a administração de drogas com o objetivo de atingir o SNC, pois além de ser uma via de entrega direta, apresenta outras vantagens, como permitir autoadministração e ausência de dor no local, o que leva a uma maior aderência do tratamento por parte do paciente. Além disso, por evitar o metabolismo de primeira passagem e degradação da droga, altas concentrações do fármaco administrado atingem o sítio de ação, com início de ação rápido (DHURIA; HANSON; FREY, 2010).

Em especial para doenças do SNC, o transporte bem-sucedido via i.n. foi demonstrado para uma variedade de biomoléculas, incluindo: peptídeos, proteínas, siRNAs, vetores de genes virais, vetores de genes não-virais e até mesmo células (ALY, A. E. E.; WASZCZAK, B. L., 2015). No contexto da pesquisa clínica na DP, um estudo de fase II iniciou-se no primeiro semestre de 2018 avaliando o efeito da administração i.n. da L-DOPA. O tratamento visa agir sobre as flutuações motoras dos pacientes com a DP e confirmar vários estudos de fase pré-clínica. Mas, além da L-DOPA, outras moléculas preveem um benefício diante da administração i.n. de substâncias em pacientes parkinsonianos, como: apomorfina e rotigotina (agonistas dos receptores dopaminérgicos); a glutathione (por seus efeitos antioxidantes); a insulina (a qual tem demonstrado efeito positivo sobre prejuízos cognitivos); e a nicotina (diante dos resultados prévios de neuroproteção) (*ClinicalTrials.gov*, 2019).

Como representante dos NTFs, o GDNF vem sendo o protagonista nos testes utilizando a via i.n. em modelos animais da DP. Inicialmente, com um trabalho avaliando o efeito de lipossomas de GDNF no modelo da 6-OHDA (MIGLIORE et al., 2014), seguido por uma publicação por outro grupo de pesquisa anos mais tarde (YUE et al., 2017) e duas publicações recentes utilizando nanopartículas de GDNF (ALY et al., 2019; HERNANDO et al., 2018). Em todos esses trabalhos, de maneira geral, evidenciou-se que o potencial neuroprotetor e restaurador do GDNF estaria preservado com a administração i.n. do NTF, apontando-a como uma boa estratégia para a terapia baseada no uso de NTFs na DP.

3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Considerando os aspectos fisiopatológicos da DP relacionados às estratégias terapêuticas atuais – meramente paliativas e limitadas pela progressão da doença; torna-se evidente a necessidade de busca por terapias que sejam modificadoras do curso natural da DP. Nesse contexto, as pesquisas com NTFs têm se sobressaído diante de resultados pré-clínicos admiráveis, especialmente com o uso do GDNF, da NRTN e, mais recentemente, do CDFN. Entretanto, a capacidade neurorestauradora dos NTFs, insuficientemente transposta aos ensaios clínicos em pacientes com a DP – através de abordagens com o GDNF e a NRTN; tem posto em pauta a sua potencialidade terapêutica. A falta de sucesso evidenciada, tem sido correlacionada principalmente à limitada biodisponibilidade dos NTFs no tecido-alvo; sendo a BHE o inicial e principal obstáculo nessa transposição. De maneira que, diante desse cenário, o presente trabalho buscará através da administração i.n. do CDFN, uma alternativa não-invasiva e eficaz para o acesso direto ao SNC. Pressupondo-se que o efeito trófico do CDFN, superior ao de ambos os NTFs já testados na clínica, aliado ao potencial da via de administração i.n., será capaz de reverter prejuízos induzidos por um modelo da DP avançada em animais.

4 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito da administração i.n. do CDNF e sua associação com a L-DOPA sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela 6-OHDA no MFB de ratos, bem como investigar o envolvimento do CDNF na DP através dos níveis e expressão de diferentes NTFs no estriado e substância negra de roedores e pacientes parkinsonianos.

4.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar o efeito neurorestaurador da administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) sobre parâmetros comportamentais, avaliados a curto, médio e longo prazo no teste do rotarod, teste do cilindro, teste de equilíbrio na trave horizontal, teste do adesivo, teste do campo aberto, teste da descida em barra vertical, teste da caminhada em escada horizontal, teste da passada, teste do labirinto em Y, teste do labirinto em cruz elevado e teste da borrifada com sacarose; bem como seu efeito sobre o peso corporal e índice de sobrevivência em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB;
- Avaliar um possível efeito neurorestaurador da administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) sobre a marcação para TH através da técnica de imunohistoquímica no estriado e na SN; bem como os níveis de CDNF endógeno na SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB;
- Comparar o efeito da administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNF recombinante humano (CDNFrh; 10 µg) sobre os níveis endógenos de CDNF (CDNFr) através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) no estriado e na SN; além de avaliar parâmetros da função motora, avaliados no teste do rotarod, teste do cilindro e o nível de lesão dopaminérgica avaliada indiretamente pelo teste de rotação com apomorfina em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB;
- Investigar o efeito do tratamento crônico com a L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) sobre parâmetros da função motora e indução de discinesias, bem como sobre o imunocontéudo de NTFs (GDNF e CDNF) analisado através da técnica de western blotting no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB;
- Utilizar conjunto de dados presente na literatura para realizar análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis estriatais de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e

NGF) em ratos tratados com a L-DOPA (discinéticos e não discinéticos) e lesionados com a 6-OHDA no MFB, bem como calcular os tamanhos de efeito de cada gene;

- Verificar um possível efeito sinérgico da associação entre a administração crônica do CDNF i.n. (10 µg) e da L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) sobre parâmetros da função motora, avaliados no teste do rotarod, teste do cilindro, teste de rotação induzido pela apomorfina e LIDs em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB;
- Verificar a existência de uma possível correlação entre os níveis estriatais de CDNF analisados por ELISA e a gravidade das LIDs avaliadas pelo somatório dos escores de AIMs em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB;
- Comparar os níveis de CDNF no estriado de animais jovens vs. idosos e animais *naive* vs. lesionados com 6-OHDA no MFB através da técnica de ELISA, bem como os níveis de GDNF no estriado e SN de animais jovens e idosos através da técnica de western blotting;
- Utilizar conjuntos de dados presente na literatura para realizar análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis estriatais de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB e eutanasiados em distintos tempos pós-lesão e em pacientes com DP classificada como leve, moderada e avançada (segundo o estadiamento de Braak); bem como calcular os tamanhos de efeito de cada gene.

5 METODOLOGIA

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (3-4 e 20-22 meses de idade, 300-400 g) do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Os ratos ficaram alojados em grupos de cinco animais por caixa (49 × 34 × 16 cm) e mantidos em condições laboratoriais padrão (ciclo de 12 horas claro-escuro, luzes acesas às 7:00 h, temperatura 22 ± 1 ° C), com livre acesso à água e ração. Os protocolos experimentais realizados neste trabalho foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA / UFSC; nº do projeto de pesquisa aprovado: PP2684260718).

5.2 DROGAS E TRATAMENTOS

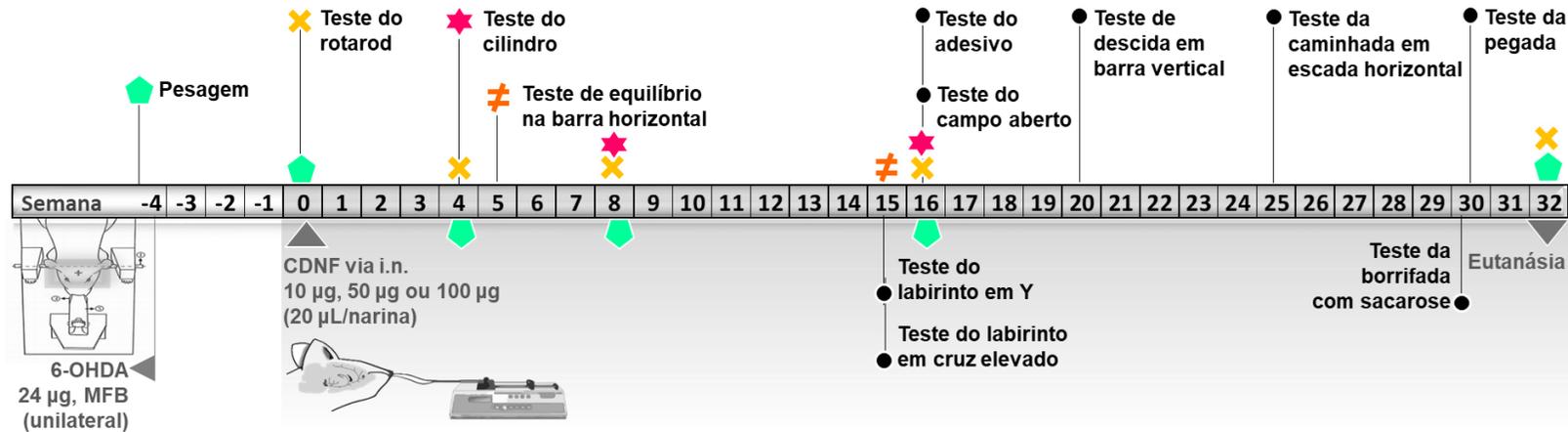
O presente trabalho utilizou a manipulação farmacológica com três diferentes objetivos: (i) indução do modelo experimental da DP avançada; (ii) estudo do potencial terapêutico de um NTF administrado por via i.n. no modelo experimental da DP avançada; e (iii) associação da terapia trófica proposta por via i.n. ao fármaco padrão no tratamento da DP.

As doses das drogas foram estabelecidas com base em trabalhos prévios da literatura (BENDER et al., 2015; DU et al., 2015; GOMES; DEL BEL, 2003; MIGLIORE et al., 2014). O cloridrato de 6-hidroxidopamina (6-OHDA; Sigma-Aldrich, MO, EUA) e o cloridrato de (R)-(-)-apomorfina (Sigma-Aldrich, MO, EUA), foram dissolvidos em uma solução veículo contendo metabissulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ a 0,01%) acrescido à solução salina (NaCl a 0,9%). O CDNF foi dissolvido em solução salina (NaCl a 0,9%) em diferentes concentrações, antecedente a sua administração (0,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 1,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ou 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Como controle interno, utilizou-se a técnica de *Western Blotting* para verificar a integridade proteica estrutural do CDNF (18,5 kDa), antes de prosseguir com sua administração intranasal. Uma curva com concentrações crescentes de proteína pode observada no **APÊNDICE II**. A solução de L-DOPA e benserazida foi obtida a partir da solubilização de comprimidos dispersíveis (Prolopa®, 100/25; Hoffman-LaRoche, RJ, Brasil), diluídos 8 vezes em água à sua concentração inicial.

5.2.1 Protocolos experimentais

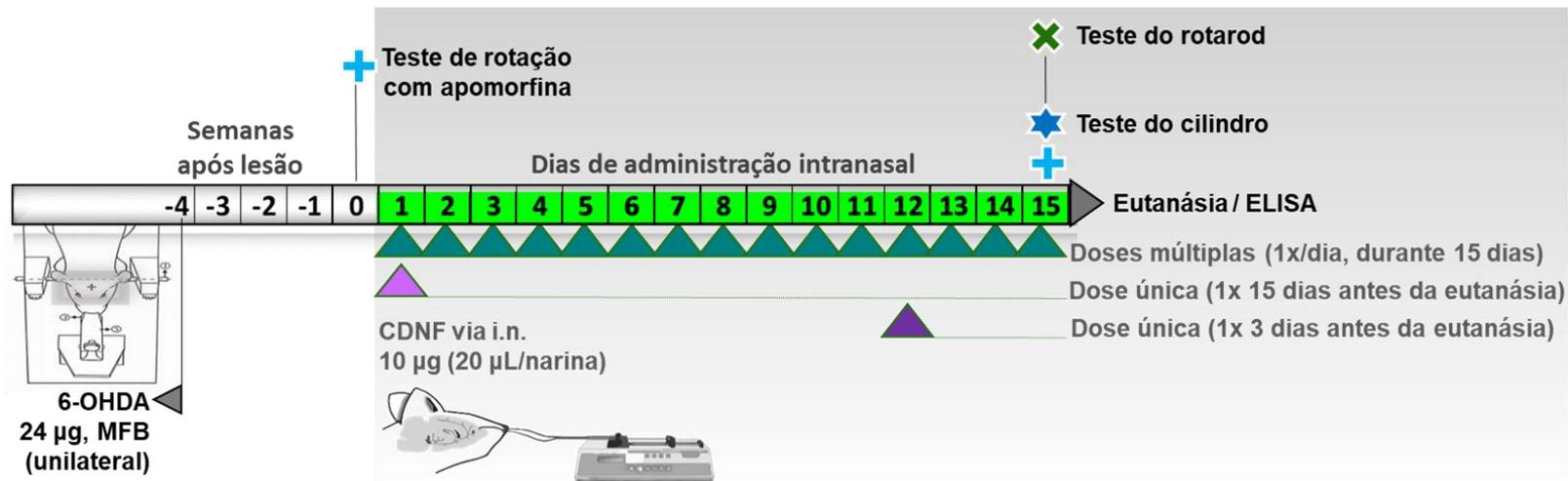
Os desenhos dos protocolos experimentais utilizados encontram-se ilustrados abaixo. Basicamente, eles foram propostos com o intuito de avaliar quatro principais aspectos: (i) efeito neurorestaurador da administração i.n. do CDNF (**Figura 9**); (ii) efeitos da administração i.n. crônica do CDNF (**Figura 10**); (iii) efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA associada ao CDNF i.n. (**Figura 11**) e (iv) níveis de NTFs no envelhecimento e na DP (**Figura 12**).

Figura 9: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação do efeito da administração intranasal do CDNF.



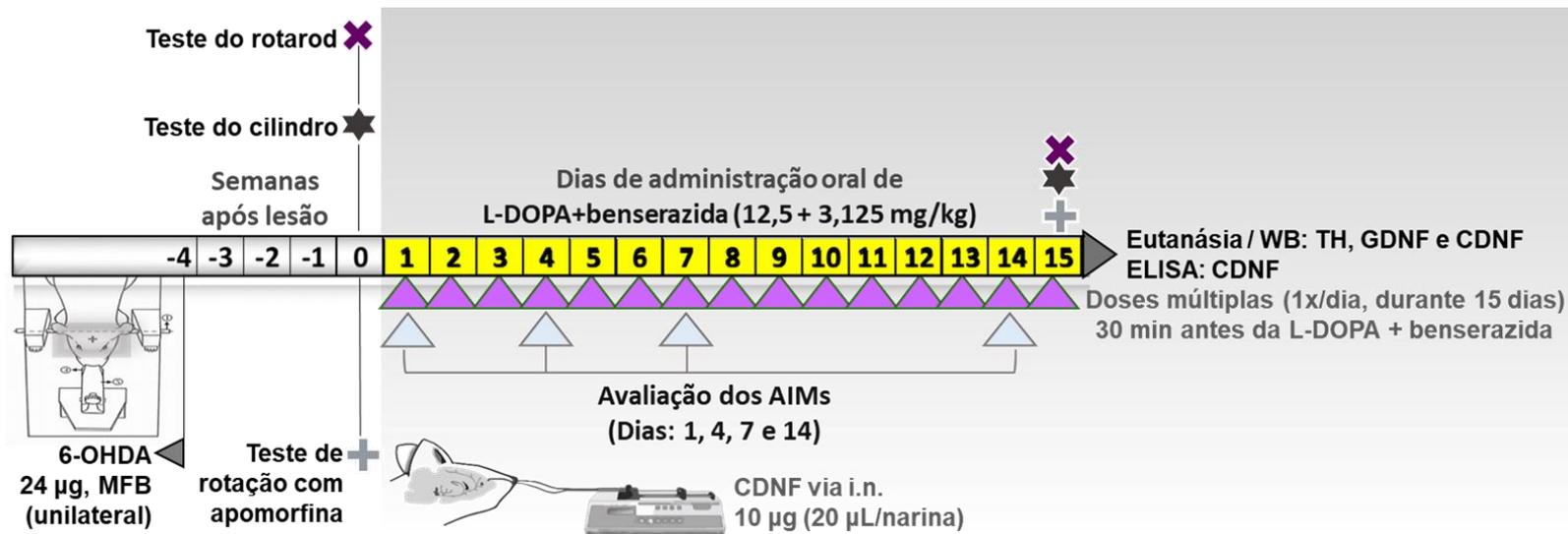
Legenda: O protocolo de avaliação do potencial neurorestaurador do CDNF administrado via i.n. teve duração de 36 semanas, a partir do seu início com a indução da lesão através de cirurgia estereotáxica e injeção da toxina 6-OHDA (24 µg) unilateralmente no MFB direito, de ratos Wistar machos (3-4 meses de idade). O acompanhamento longínquo permitiu a avaliação do efeito do CDNF i.n. a curto, médio e longo prazo. A administração do CDNF i.n. foi realizada 4 semanas após, tempo onde a lesão com a 6-OHDA já se encontra estável. O acompanhamento do peso corporal dos animais foi realizado durante todo o protocolo, como um indicativo do bem-estar geral dos animais. Testes comportamentais para avaliar a função motora dos animais (representados na parte superior do esquema) e condições não motoras (representadas na parte inferior do esquema), foram organizados de maneira a explorar o potencial do CDNF i.n. em comportamentos sabidamente comprometidos em pacientes com a DP e intercalados por todo o protocolo. Ao final das 32 semanas pós-administração do CDNF i.n., foi realizada a verificação do grau de neurodegeneração dopaminérgica, através da técnica de imunohistoquímica (realizada em fatias da SNc e estriado dorsal e ventral), além da imunodeteção de CDNF (estriatal). Os símbolos representam a frequência e período de repetição dos respectivos testes ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal.

Figura 10: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação dos efeitos da administração intranasal crônica do CDNF.



Legenda: O protocolo de avaliação dos efeitos da administração i.n. crônica do CDNF teve duração de 19 semanas, a datar do seu início com a indução da lesão através de cirurgia estereotáxica e injeção da toxina 6-OHDA (24 µg) unilateralmente no MFB direito, de ratos Wistar machos (3-4 meses de idade). A administração do CDNF i.n. foi iniciada após a lesão com a 6-OHDA já encontrar-se estável. O tratamento com o CDNF i.n. na dose de 10 µg ocorreu diariamente durante 15 dias, ou a partir de uma única administração do NTF (15 ou 3 dias antes da eutanásia dos animais). Testes comportamentais para avaliar a função motora dos animais (representados na parte superior do esquema), foram organizados de maneira a explorar o potencial do tratamento crônico. Avaliou-se o desempenho dos animais antes e após o tratamento crônico com o CDNF i.n. através do teste de rotação com apomorfina; ou somente ao final do protocolo de tratamento crônico com o CDNF i.n. através do teste do rotarod e teste do cilindro. Ao final do protocolo foi realizada a quantificação dos níveis do CDNF estriatais do rato, através da técnica de ELISA. Os símbolos representam a frequência e período de repetição dos respectivos testes ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal; ELISA: Ensaio de imunoabsorção enzimática.

Figura 11: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação dos efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA associada ao CDNF intranasal.



Legenda: O protocolo de avaliação dos efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA associada ao CDNF i.n. teve duração de 19 semanas, a datar do seu início com a indução da lesão através de cirurgia estereotáxica e injeção da toxina 6-OHDA (24 µg) unilateralmente no MFB direito, de ratos Wistar machos (3-4 meses de idade). A administração do CDNF i.n. ou do CDNF i.n. associado a L-DOPA foi iniciada 4 semanas após, tempo onde a lesão com a 6-OHDA já se encontra estável. O tratamento com o CDNF i.n. na dose de 10 µg ocorreu diariamente durante 15 dias, 30 min antes do tratamento v.o. com a L-DOPA (12,5 mg/kg, benserazida 3,125 mg/kg). Testes comportamentais para avaliar a função motora dos animais, foram organizados de maneira a explorar o potencial do tratamento crônico da associação entre o CDNF i.n. a L-DOPA v.o. Avaliou-se o desempenho dos animais antes e após o tratamento crônico associado através do teste de rotação com apomorfina, teste do rotarod e teste do cilindro. Neste mesmo protocolo avaliou-se as LIDs através dos escores de AIMs, nos dias 1, 4, 7 e 14 de administração da L-DOPA ou da associação. Ao final do protocolo foi realizada a quantificação dos níveis de TH, GDNF e CDNF no estriado, através da técnica de *Western Blotting*; e do CDNF estriatal do rato, através da técnica de ELISA. Os símbolos representam a frequência e período de repetição dos respectivos testes ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal; WB: *Western Blotting*; ELISA: Ensaio de imun absorção enzimática.

Figura 12: Desenho experimental do protocolo utilizado para avaliação dos níveis de fatores neurotróficos no envelhecimento e na doença de Parkinson.



Legenda: O protocolo de avaliação dos níveis de NTFs (CDNF e GDNF) em decorrência do envelhecimento ou do modelo da DP, teve dois formatos. (1). Para quantificação do CDNF: ratos jovens (3 a 4 meses de idade) e idosos (20 a 22 meses de idade), foram eutanasiados após atingirem a idade referida e em sequência foram quantificados os níveis do CDNF estriatais por ELISA (parte superior da figura). (2). Para quantificação do CDNF: ratos jovens (3 a 4 meses de idade) e idosos (20 a 22 meses de idade), SHAM ou lesionados unilateralmente com a 6-OHDA (24 µg) no MFB, foram eutanasiados após atingirem a idade referida e em sequência foram quantificados os níveis do GDNF no estriado e na SN por ELISA através da técnica de *Western Blotting* (parte inferior da figura). Os símbolos representam a frequência e período de repetição dos respectivos testes ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; WB: *Western Blotting*; ELISA: Ensaio de imun absorção enzimática.

5.3 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

A cirurgia estereotáxica foi realizada sob anestesia com injeção intraperitoneal (i.p.) de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Os ratos foram posicionados no aparelho estereotáxico (KOPF® Instruments, CA, EUA) e após a desinfecção da pele, receberam 0,3 mL de lidocaína com adrenalina (10 mg/mL) local, via subcutânea (s.c.). Uma incisão foi feita de modo a expor o crânio e, após a identificação das coordenadas de injeção, perfurou-se a dura-máter utilizando uma broca de alta velocidade. Para a infusão da 6-OHDA foi utilizado uma seringa Hamilton de 10 µL acoplada a uma bomba peristáltica (Insight® Equipamentos Científicos, SP, Brasil) e conectada através de um tubo de polietileno à uma agulha de aço (26G) na extremidade oposta. A 6-OHDA (Sigma-Aldrich, MO, EUA) na dose de 24 µg, a uma concentração de 8 µg/µL, foi infundida unilateralmente no feixe prosencefálico medial (MFB) direito. As coordenadas utilizadas relativas ao bregma e à dura-máter (em mm) foram: anteroposterior (AP): -4,4; médio-lateral (ML): -1,2 e dorsoventral (DV): -8,2. A infusão da 6-OHDA ocorreu a uma vazão de 1 µL/min e a agulha foi deixada no local por mais 4 min após a injeção. Os ratos SHAM-operados (cirurgia controle) seguiram o mesmo protocolo cirúrgico, exceto pelo fato de ter sido substituído a 6-OHDA pela solução veículo (NaCl a 0,9% contendo metabissulfito de sódio a 0,01%). As coordenadas estereotáxicas foram definidas com base no atlas de neuroanatomia de rato de Paxinos e Watson (2009) e o protocolo de cirurgia adaptado de Gomes e Del Bel (2003). No pós-operatório os animais receberam flunixin s.c. (2,5mg/kg) para alívio da dor e solução salina (NaCl a 0,9%) aquecida à 37 °C, sendo devidamente acompanhados após a realização do procedimento cirúrgico, com observação de quaisquer alterações físicas e comportamentais que indicassem dor.

5.4 ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL

Para a administração por via intranasal (i.n.), os ratos foram anestesiados com isoflurano a 0,96% e posicionados em decúbito dorsal com a cabeça plana na superfície e o nariz na vertical ($\approx 90^\circ$), conforme demonstrado por Van Den Berg et al. (2002). A administração i.n. do CDNF foi realizada com o auxílio de um tubo de polietileno (PE-10) inserido aproximadamente 7 mm na narina do animal. O tubo de polietileno foi conectado a uma bomba peristáltica (Insight® Equipamentos Científicos, SP, Brasil) ajustada para uma vazão de 10 µL/min através de uma seringa Hamilton de 20 µL. O CDNF foi produzido como

descrito por Latge et al. (2015) e preparado em diferentes concentrações logo antes de sua administração (0,25 µg/µL, 1,25 µg/µL ou 2,5 µg/µL, dissolvido em NaCl a 0,9%), mantendo-se fixo o total de volume administrado (40 µL/animal, 20 µL/narina). Dessa forma, as doses do CDNF i.n. administradas foram de 10, 50 e 100 µg/animal, sendo a utilização de tais doses baseada em estudos prévios de administração i.n. do GDNF (BENDER et al., 2015; MIGLIORE et al., 2014). Entre as infusões do CDNF em cada narina, os animais tiveram um intervalo de 1min para recuperação da função cardiorrespiratória. O grupo controle seguiu o mesmo protocolo, exceto pelo fato de o veículo (NaCl a 0,9%) ter sido administrado em vez do CDNF. O procedimento de administração i.n. foi adaptado de Prediger et al. (2006).

5.5 AVALIAÇÕES COMPORTAMENTAIS: EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Os animais foram submetidos a diferentes testes comportamentais para avaliação de parâmetros da função motora e não motora, bem como acompanhados quanto a indicadores do bem-estar geral. Todos os testes e avaliações foram conduzidas durante o ciclo claro dos animais (7:00 h às 19:00 h), em salas com iluminação ambiente de baixa intensidade (12 lux), isolamento acústico e antessala para prévia ambientação dos animais por pelo menos 60 min antes do início dos testes. Afim de evitar vieses devido a resíduo de odores, os aparatos foram limpos com uma solução de etanol 10-70% e secos com papel toalha logo após a retirada de cada animal. As avaliações comportamentais foram gravadas através de um sistema de monitorização com câmeras posicionadas nas salas experimentais e as imagens obtidas foram armazenadas para posterior análise com auxílio do software ANY-maze® (Stoelting Co., IL, EUA).

5.5.1 Testes para avaliação de parâmetros comportamentais motores

5.5.1.1 Teste do rotarod

O teste do rotarod avalia de habilidades motoras como a marcha, coordenação inter-membros e equilíbrio. O desempenho no teste é comumente mensurado mediante o tempo em que o animal permanece em uma haste horizontal rotativa, sendo assim registrado a latência para a queda do rotarod. Para a execução do teste, os animais foram posicionados sobre o aparato (Insight® Equipamentos Científicos, SP, Brasil) e treinados durante 30 s para a

permanência sob a haste estacionária (zero rotações por minuto – r.p.m.), seguido pelo treinamento durante 90s sob a haste em rotação constante (5 r.p.m.). Os animais que ultrapassaram o número máximo de quedas permitidas durante a sessão de treino (5 quedas) foram excluídos de sessões posteriores, de modo que todos os grupos apresentassem desempenho basal semelhante. As sessões de teste no rotarod corresponderam à verificação da latência para a queda diante da aceleração do rotarod, onde a velocidade inicial de 5 r.p.m. era incrementada com 0,1 revoluções/s, atingindo o máximo de 35 r.p.m. após o tempo máximo de 300 s. O desenho deste protocolo foi baseado em trabalhos prévios da literatura (BUITRAGO et al., 2004; CORDOVA et al., 2012).

5.5.1.2 Teste do cilindro

O teste do cilindro avalia o comportamento de lateralidade diante de manipulações experimentais. No teste é mensurado o apoio das patas dianteiras após lesões unilaterais em núcleos encefálicos responsáveis pelas funções motoras, e o comprometimento motor tende a apresentar-se como um viés de lateralidade (no lado contralateral à lesão). O cilindro incentiva a exploração vertical e o repouso após cada retaguarda e, portanto, o teste se baseia na curiosidade inerente dos roedores em explorar um novo ambiente. Para realização do teste, os animais foram colocados dentro de um cilindro transparente (24 cm de diâmetro × 30 cm de altura) para registro dos contatos das patas dianteiras à parede do cilindro durante 5 min. Como a medida do desfecho primário envolve a assimetria entre o membro afetado e não afetado, cada animal fornece seu próprio controle para diferenças individuais em motivação e exploração. Assim, foram computados os atos de encostar das patas ipsilateral e contralateral à lesão, bem como de ambas as patas simultaneamente na parede do cilindro e posteriormente calculou-se a porcentagem de uso da pata lesionada em relação à intacta. Este protocolo experimental foi semelhante ao demonstrado para o teste em camundongos (BROOKS; DUNNETT, 2009).

5.5.1.3 Teste de equilíbrio na barra horizontal

O teste de equilíbrio na barra horizontal propicia medidas de estabilidade e balanço dos animais. No teste é avaliada a capacidade dos animais em manter equilíbrio sobre uma estreita barra horizontal. Para análise do teste foram designados escores de acordo com o tempo de permanência em equilíbrio sobre a barra horizontal: 0 = 60 s; 1 = 40-59 s; 2 = 20-39 s e 3 =

0-19 s; ou seja, pontuações mais altas representam um maior comprometimento motor no teste. Para a execução do teste, os animais foram gentilmente posicionados com as 4 patas sobre a barra horizontal (de aproximadamente 20 mm de diâmetro e afastada cerca de 90 cm do chão), de modo que seu corpo ficasse em orientação oposta ao sentido da barra e foram mantidos pelo tempo máximo de 60 s. O teste foi executado a partir de uma versão aprimorada do “*horizontal bars*” para o uso em ratos, sem que houvesse a necessidade de travessia da barra horizontal (AU - DEACON, 2013).

5.5.1.4 Teste do adesivo

O teste do adesivo avalia especialmente a competência motora fina e a simetria na destreza e mobilidade das patas dianteiras dos animais. No teste é avaliada também a capacidade proprioceptiva do animal e o componente motivacional da acinesia na avaliação de habilidades motoras finas, além de mensurar a sobrecarga tátil unilateral. Para realização do teste foram colados pequenos adesivos na porção distal-radial palmar (10 mm × 10 mm) de ambas as patas dianteiras (em uma ordem aleatória). Logo em seguida, os animais foram postos dentro de um cilindro transparente (24 cm de diâmetro × 30 cm de altura) e registrado o tempo para entrar em contato com o rótulo e removê-lo. Os resultados foram obtidos a partir de duas sessões de teste (aplicadas com intervalo médio de 10 min) e representados como a média das duas sessões de avaliação, sendo cada animal avaliado por um tempo máximo de 120 s. Este protocolo comportamental foi baseado nos seguintes trabalhos prévios da literatura (BOUET et al., 2009; FRERET et al., 2007).

5.5.1.5 Teste do campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para determinar a atividade locomotora horizontal espontânea dos animais. Além de parâmetros como distância e velocidade, normalmente analisados no teste, o perfil deambulação e ocupação das zonas do aparato também pode ser explorado. Para execução do teste, os animais foram posicionados no centro de uma arena aberta (100 cm × 100 cm × 40 cm), sendo registrada a movimentação no aparato durante 5 min. As medidas de distância total percorrida, tempo na zona central do aparato, velocidade máxima e o número de rotações no sentido horário e anti-horário, bem como o mapeamento da ocupação e permanência dos animais nas zonas do campo, foram avaliados no

teste. Este protocolo foi realizado de acordo com procedimentos preconizados no próprio laboratório (AGUIAR et al., 2009).

5.5.1.6 Teste de descida em barra vertical

O teste de descida em barra vertical é destinado a avaliar, além do equilíbrio e coordenação motora, a bradicinesia dos animais. No teste é averiguada a capacidade do animal de agarrar-se e manobrar em uma haste vertical para descer até sua caixa moradia. Para este teste, os animais foram posicionados logo abaixo do topo de uma barra com superfície áspera (100 cm de comprimento \times 20 mm de diâmetro) posicionada verticalmente sobre uma caixa com serragem, com a face orientada para a extremidade superior da haste. Foram então mensurados os parâmetros de latência para virar (orientar-se para a extremidade inferior da haste) e latência para descer (chegar a caixa moradia) da barra vertical. O experimento foi realizado em duas etapas, treino e teste, com intervalo médio de 24 h entre cada repetição e o tempo máximo atribuído ao animal para execução da tarefa foi de 120 s por sessão. Este protocolo foi baseado em trabalhos prévios da literatura (MEREDITH; KANG, 2006; TANRIOVER et al., 2010).

5.5.1.7 Teste da caminhada em escada horizontal

O teste da caminhada em escada horizontal avalia a coordenação motora aliada à precisão da marcha dos animais. O aparato onde os animais são testados consiste em uma passarela com duas paredes verticais (100 cm de comprimento \times 20 cm de altura) conectadas por barras de metal (10 cm de comprimento \times 3 mm de diâmetro) e espaçadas em intervalos irregulares (de 1 cm, 2 cm e 3 cm), que funcionam como degraus de uma escada. Pois, a posição de partida dos animais (caixa neutra) é elevada cerca de 20 cm em relação ao ponto de chegada dos animais (caixa moradia com serragem). Ao caminhar sobre o aparato os animais devem coordenar a colocação das patas anteriores e posteriores e firmar-se sobre as barras de metal, de modo a evitar que escorreguem pelos intervalos irregularmente espaçados. Assim, após os animais serem posicionados na extremidade de partida do aparato, foram registrados os parâmetros de latência para alcançar o ponto de chegada e o número total de erros durante a realização da tarefa de acordo com as falhas no posicionamento das patas durante a travessia. Foram pontuados como erros somente as ocasiões onde o membro perdia completamente o

alcance de um degrau, ou seja, não o tocava e ocorria a queda total da pata por entre as grades e a perda de equilíbrio e postura do corpo. O experimento contou com uma sessão de treino e teste, realizadas com um intervalo médio de 15 min entre elas. O tempo máximo atribuído ao animal para execução da tarefa foi de 120 s por sessão. O protocolo executado para realização desse teste foi baseado em trabalhos prévios presentes na literatura (METZ; WHISHAW, 2009; SCHÖNFELD et al., 2017).

5.5.1.8 Teste da pegada

O teste da pegada consiste na metodologia mais comumente empregada para avaliar a marcha dos animais. No teste, são pintadas as patas dos animais e os padrões de marcha demarcados sobre uma superfície para registro das pegadas. O aparato utilizado foi o mesmo do teste da caminhada em escada horizontal (4.5.1.7), com exceção do piso que foi substituído por uma superfície sólida coberta por um papel absorvente e a ausência de inclinação. Após os animais terem suas patas dianteiras pintadas, serem postos e atravessarem o aparato, suas patas ficaram impressas sobre o papel e os moldes de pegada foram analisados manualmente quanto ao comprimento da passada, representado pela distância média da projeção de cada uma das patas em um movimento à frente. O teste foi realizado em duplicata, com intervalo médio de 24 h entre as sessões e os dados representam a média de ambas. O tempo máximo atribuído ao animal para execução da tarefa foi de 120 s por sessão. Este protocolo baseou-se em trabalhos prévios da literatura (BROOKS; DUNNETT, 2009; CARTER; MORTON; DUNNETT, 2001).

5.5.1.9 Teste de rotação induzido pela apomorfina

O teste de rotação induzido pela apomorfina constitui a principal forma de avaliação comportamental para o monitoramento do grau desnervação frente a lesões dopaminérgicas proencefálicas unilaterais em animais. Após a lesão unilateral com a 6-OHDA no MFB, avaliou-se o número de rotações contralaterais à lesão induzidos pela apomorfina, agonista direto dos receptores de DA. Para a realização do teste foi administrado hidrocloreto de R-(–)-apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.) e realizada a análise do comportamento rotatório dos animais em aparatos cilíndricos (24 cm de diâmetro × 30 cm de altura) durante 30 min. O número de rotações, giros na direção cabeça-cauda 360°, no sentido horário (ipsilateral à lesão) e anti-

horário (contralateral à lesão) foi avaliado manualmente. O protocolo experimental utilizado neste teste foi baseado em Padovan-Neto et al., 2009.

5.5.2 Testes para avaliação de parâmetros comportamentais não motores

5.5.2.1 Teste do labirinto em Y

O teste do labirinto em Y na versão de alternâncias espontâneas permite o acesso à memória operacional espacial, além de questões atencionais e motivacionais dos animais. O comportamento de alternância espontânea é uma característica intrínseca de roedores, eles tendem a intercalar suas escolhas não-reforçadas em um labirinto em Y de maneira sucessiva. O aparato utilizado para o teste do labirinto em Y possui três braços (50 cm × 10 cm × 20 cm) afastados por uma angulação de 120 °, feitos de madeira e cobertos com fórmica impermeável. Para realização do teste, os animais foram introduzidos no centro do aparato em forma de Y e deixados explorar livremente os braços do labirinto, durante 8 min. Ao final, registrou-se a sequência e o número de entradas nos braços e foi calculado a porcentagem de alternâncias corretas. Para o cálculo da porcentagem foi feita a razão entre o número de alternâncias corretas e o total de entradas nos braços (determinada pela passagem alternada em cada um dos braços) menos dois e multiplicado por 100 [(% de alternâncias corretas = n° de alternâncias corretas / total de entradas nos braços - 2) x 100]. Além disso, o total de entradas nos braços foi empregado como índice de atividade locomotora dos animais. A entrada em um braço foi definida como a colocação de todas as quatro patas no braço. A execução deste teste foi baseada em protocolos presentes na literatura (HUGHES, 2004; PRIEUR; JADAVJI, 2019).

5.5.2.2 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado trata-se de um paradigma comportamental reconhecido para a avaliação de comportamentos relacionados à ansiedade e identificação de compostos com efeitos ansiolíticos ou ansiogênicos em animais. O modelo explora o conflito entre a curiosidade inata que roedores têm em explorar ambientes novos e a aversão natural à altura e espaços abertos. O aparato utilizado para o teste consiste em dois braços abertos opostos (50 cm × 10 cm) cercados por uma borda de acrílico de 1 cm de altura, cruzados em ângulo reto por dois braços fechados (50 cm × 10 cm × 40 cm) e unidos por uma plataforma central (10 cm

× 10 cm), feitos de madeira com fórmica impermeável, à uma altura de 50 cm do chão. Para o teste, os animais foram colocados na área central do labirinto de frente para um braço fechado e o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos e fechados foram registrados durante 7 min (sendo os 2 min iniciais excluídos da análise). A partir do comportamento dos animais, foram analisadas as respectivas respostas emocionais e locomotora: porcentagem de tempo e entradas de braços abertos, assim como a expressão de comportamentos de avaliação de riscos (ato de aproximação e investigação da área de transição aos braços abertos) e o número de entradas de braços fechados. A entrada em um braço foi definida como a colocação de todas as quatro patas no braço. O protocolo utilizado para o teste foi baseado em trabalhos presentes na literatura (LOPES et al., 2016; SOUZA et al., 2013).

5.5.2.3 Teste da borrifada com sacarose

O teste da borrifada com sacarose avalia o estado hedônico, a partir do comportamento de autocuidado e motivacional dos animais. No teste, devido à viscosidade de uma solução de 10% de sacarose esguichada na região dorsal dos animais, que entremeia a pelagem, eles exibem uma típica conduta de autolimpeza (do inglês, *grooming*). O procedimento realizado no teste consistiu, portanto, em esguichar por duas vezes uma solução de sacarose 10% sobre o dorso do rato (um esguicho em cada região dorsolateral). Em seguida, os animais foram colocados numa caixa de acrílico (40 cm × 40 cm) e observados por um período de 15 min. Durante esse período registrou-se a latência para início do comportamento de autolimpeza e o tempo total de autolimpeza direcionado ao dorso. O comportamento de limpeza incluiu somente a limpeza do dorso (lambadura do corpo). O protocolo utilizado foi baseado em trabalhos prévios do grupo (MACHADO et al., 2012; MATHEUS et al., 2016).

5.5.3 Teste para avaliação das discinesias induzidas pela L-DOPA

5.5.3.1 Avaliação de movimentos involuntários anormais

A avaliação de movimentos involuntários anormais (AIMs, do inglês: *abnormal involuntary movements*) serve como base para o monitoramento das LIDs. Para a visualização dos AIMs os animais devem estar sob efeito de altas concentrações de L-DOPA em um regime de tratamento crônico, que aliado a uma extensa neurodegeneração, permite o desenvolvimento

das LIDs. Para a avaliação, os animais foram colocados individualmente em cilindros transparentes (24 cm de diâmetro × 30 cm de altura) e seus movimentos foram analisados durante 1min, com um intervalo de 10min entre as avaliações. O tempo total de observação foi de 2 h após a administração v.o. da L-DOPA (12,5 mg/kg), combinada com a benserazida (3,125 mg/kg). Os AIMs foram subdivididos em 4 diferentes classes de LIDs, de acordo com a topografia de acometimento:

- i) discinesia axial: posturas torcidas do tronco superior e pescoço, orientados de maneira contralateral ao lado da cirurgia;
- ii) discinesia de membro anterior: distonia ou movimentos hiperkinéticos da pata anterior contralateral à lesão, seja no plano sagital ou frontal;
- iii) discinesia orolingual: espasmos da musculatura orofacial e protrusão da língua com orientação contralateral ao lado da cirurgia;
- iv) discinesia de locomoção: rotações contralaterais à lesão.

Para cada uma das classes foi computado um escore de 0-4 pontos, de acordo com a frequência e severidade do AIM (sendo, 0 = ausência; 1 = presença < 30 s; 2 = presença > 30 s; 3 = durante 1 min, interrompida por distração sensorial e 4 = durante 1 min ininterrupto). Os resultados da avaliação foram representados como o somatório dos escores de AIMs nos 12 tempos de observação e das quatro classes de LIDs. A dose da L-DOPA e o sistema de escores para a avaliação das discinesias baseou-se em trabalhos presentes na literatura (CENCI, M ANGELA; LUNDBLAD, 2007; DU et al., 2015).

5.5.4 Avaliação de parâmetros relacionados ao bem-estar geral dos animais

5.5.4.1 Avaliação do peso corporal

O peso corporal dos animais é frequentemente acompanhado como uma medida do desenvolvimento, bem-estar geral e avaliação do surgimento de efeitos adversos diante de manipulações experimentais. Os animais foram pesados semanalmente durante os protocolos experimentais, sempre antecedendo o início das avaliações comportamentais e utilizando-se a mesma balança.

5.5.4.2 Avaliação do índice de sobrevivência

A avaliação do índice de sobrevivência dos animais fornece indícios do surgimento de complicações graves diante de manipulações experimentais. Para tal, os animais foram acompanhados durante os protocolos e relatou-se a ocorrência e frequência de óbitos. Os resultados foram expressos como uma curva de sobrevivência a partir da porcentagem de sobrevivência dos animais durante um determinado período de tempo.

5.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS: EXPERIMENTOS *EX VIVO*

5.6.1 *Western Blotting*

A técnica de *Western Blotting* foi utilizada para quantificação da TH, CDNF e GDNF no estriado e na SN dos animais. O protocolo utilizado foi baseado em Lopes et al., 2015.

5.6.1.1 *Obtenção e preparo das amostras*

Os animais foram anestesiados com isoflurano e rapidamente ortotansados por decapitação. O estriado (ipsi- e contralateral à lesão) dos animais foram dissecados a 4 °C, colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até a determinação dos níveis de TH, CDNF e GDNF. Para preparo das amostras, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em 300 µL do tampão de homogeneização (Tris 50 mM, pH 7,0; EDTA 1 mM; NaF 100 mM; PMSF 0,1 mM; Na₃VO₄ 2 mM; Triton X-100 1%; glicerol 10% e coquetel inibidor de proteases, Sigma-Aldrich, MO, EUA). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10min a 4 °C) para eliminar os restos celulares, e os sobrenadantes diluídos 1/1 (v/v) em solução contendo Tris 100 mM, pH 6,8; EDTA 4 mM e SDS 8% e aquecidos a 100 °C, por 5min. A seguir, foram adicionados nas amostras o tampão de diluição (Tris 100 mM, glicerol 40% e azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%). A dosagem de proteínas foi determinada com o método descrito por Peterson (PETERSON, 1977).

5.6.1.2 *Eletroforese e eletrotransferência*

As proteínas foram separadas através de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se gel de separação a 15% e gel de entrada a 4%. A eletroforese foi realizada com corrente fixa de 40 mA e voltagem máxima de

150 mV durante aproximadamente 2 h. Após a corrida, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose usando um sistema *semi-dry* (1,2 mA/cm², por 1,5 h). Para verificar a eficiência do processo de transferência visualizou-se as proteínas e o marcador de peso molecular (BioRad®, ON, Canadá) através de *Coomassie blue* para corar os géis e *Ponceau S* para corar as membranas.

5.6.1.3 *Imunodeteccção de TH, CDNF e GDNF*

As membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (TBS; Tris 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) por 1h e, após sucessivas lavagens com TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,5), incubadas *overnight* a 4 ° C com os anticorpos específicos para TH, CDNF, GDNF e β -actina. Os anticorpos foram diluídos em TBS-T contendo BSA (do inglês, *bovine serum albumin*) a 2% nas diluições: 1:1000 (anti-TH ab112 produzido em *rabbit*, Abcam, CBG, UK); 1:1000 (anti-CDNF ab1 produzido em *rabbit*, PRS4343, Sigma-Aldrich, MO, EUA); 1:1000 (anti-GDNF produzido em *rabbit*, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA) e 1:2500 (anti- β -actina produzido em *mouse*, sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, TX, EUA). Para a deteção dos complexos imunes, as membranas foram incubadas por 1h com anticorpo secundário anti-*mouse* ou anti-*rabbit* conjugado à peroxidase *horseradish* (HRP) e reveladas em aparelho fotodocumentador ChemiDoc MP® (Bio-Rad, CA, EUA) após a emissão de quimiluminescência induzida por reagentes adicionados à membrana de nitrocelulose utilizando o sistema ECL® (PerkinElmer, MA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as etapas de bloqueio e incubação foram seguidas por três lavagens de 5 min cada com TBS-T. As membranas foram incubadas com o anticorpo anti- β -actina para verificar se as mesmas quantidades de proteínas foram aplicadas no gel.

5.6.1.4 *Quantificação dos níveis de proteínas*

Os imunoconteúdos de TH, CDNF e GDNF foram determinados pela razão entre a densidade óptica (D.O.) da banda das respectivas proteínas e a D.O. da banda da β -actina. O anticorpo anti-TH total, detecta uma única banda de aproximadamente 60 kDa; enquanto os anticorpos anti-CDNF e anti-GDNF detectam bandas que foram quantificadas aproximadamente em 11 kDa e 31 kDa, respectivamente; o anticorpo anti- β -actina detecta uma

única banda de aproximadamente 45 kDa. As bandas foram quantificadas utilizando o programa ImageJ® (versão 1:52R; NIH, MD, EUA).

5.6.2 Imunohistoquímica

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para quantificação da TH e CDNF no estriado e na SN dos animais. O protocolo utilizado baseou-se em Padovan-Neto et al., 2015 e Zhang et al., 2018.

5.6.2.1 Perfusão transcardíaca e coleta dos tecidos

Os animais foram anestesiados com isoflurano e perfundidos através do miocárdio com cerca de 250 mL de solução salina (NaCl a 0.9%, 4 °C) contendo heparina (100 µL de heparina 25.000 UI por litro de solução) seguido de solução de 300 a 500 mL de paraformaldeído (PFA a 4%, 4 °C, pH 7,4). Os cérebros foram removidos imediatamente, pós-fixados em PFA a 4% por 24 h e crioprotetidos em solução de sacarose a 30% por 72h. Os encéfalos foram rapidamente congelados durante cerca de 30 s em isopentano a -40 °C. As amostras congeladas foram acondicionadas em envelopes de papel alumínio e armazenadas em freezer -80 °C para subsequente processamento histológico.

5.6.2.2 Processamento do tecido

Cortes coronais de 30 µm foram processados em criostato a -20 °C (Leica, HE, Alemanha) em toda a extensão rostro-caudal do estriado (1,2 a -0,92 mm) e da SN (-5,85 a -6,04 mm) (a partir do bregma, atlas de Paxinos e Watson, 2009). As fatias foram armazenadas em microtubos de plástico em solução anticongelante a -20 °C até a realização da imunohistoquímica de secções rostrais, mediais e caudais em triplicata.

5.6.2.3 Imunohistoquímica para TH e CDNF

Para a recuperação de antígeno, as fatias foram lavadas (3 x 5min) em PBS 0,1 M + 0.15 % Triton-X (pH 7.4; tampão de lavagem – T.A), transferidas para uma solução de citrato de sódio 10 mM e então mantidas por 30 min a 70 °C, sob leve agitação. Para bloquear a

atividade da peroxidase endógena, as fatias foram novamente lavadas (3 x 5min) com tampão de lavagem e pré-incubadas por 30 min com solução de peróxido de hidrogênio 1% em T.A. Para evitar reações inespecíficas, as fatias foram lavadas (3 x 5 min) e incubadas em uma solução de BSA a 2% em T.A com soro *goat* a 5% em T.A, durante 1 h. As fatias foram então incubadas com o anticorpo primário (anticorpo policlonal anti-TH ab112 produzido em *rabbit*, na diluição 1:1500, Abcam, CBG, UK; anticorpo policlonal anti-CDNF ab1 produzido em *rabbit*, na diluição 1:500, PRS4343, Sigma-Aldrich, MO, EUA) por 48 h a uma temperatura de 16 ° C, sob leve agitação. Em seguida, as fatias foram lavadas com o T.A (3 x 5 min) e incubadas com o anticorpo secundário (anticorpo biotilado *goat* anti-*rabbit*, na diluição 1:400, Vector, CA, USA) por 90 min. As fatias foram novamente lavadas com o T.A (3 x 5min), e incubadas com o complexo avidina-biotina (na diluição de 1:300 em T.A) por 2h, para novamente serem lavadas em T.A (3 x 5 min). Para revelação, foi utilizado como cromógeno: 3,3'-diaminobenzidina (DAB) para anti-TH ou DAB-níquel para anti-CDNF. As fatias foram posteriormente montadas em lâminas e lamínulas para observações microscópicas.

5.6.2.4 Obtenção e análise das imagens

As análises foram realizadas em ambos os hemisférios (ipsi- e contralateral à lesão) no estriado e na SN. As configurações da câmera e as condições de luz foram otimizadas para evitar a saturação do sinal e mantidas constantes até o final da análise. As imagens (20x) foram capturadas por uma câmera de vídeo (DFC420, Leica, HE, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico (DMRB, Leica, HE, Alemanha) e transmitidas a um computador equipado com um programa de análise de imagens Leica *Application Suite*® (versão 3.0.4, Leica, HE, Alemanha) para ajustes de cor e luz. As análises foram realizadas no programa ImageJ® (versão 1:52R; NIH, MD, EUA). As quantificações a partir da D.O. foram realizadas em secções mediais no estriado dorsal e ventral e na SNc dorsal.

5.6.3 ELISA

A técnica de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi utilizada para quantificação do CDNF no estriado dos animais. O protocolo utilizado foi baseado em Nadella et al., 2014.

5.6.3.1 Obtenção e preparo das amostras

Os animais foram anestesiados com isoflurano e rapidamente ortotanasiados por decapitação. O estriado contralateral à lesão dos animais foi dissecado a 4 ° C, colocados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 ° C até a determinação dos níveis de CDFN. Para preparo das amostras, os tecidos foram homogeneizados mecanicamente em 400 µL do tampão de homogeneização (Tris 100 mM, pH 7,0; EDTA 2 mM; NaF 200 mM; PMSF 100 mM; Na₃VO₄ 200 mM; Triton 100%; glicerol 50% e coquetel inibidor de proteases, Sigma-Aldrich, MO, EUA). Os lisados foram centrifugados (10.000 x g por 10min a 4 ° C) e os sobrenadantes coletados para posterior dosagem de proteínas totais e do CDFN por ELISA.

5.6.3.2 Dosagem de proteínas totais

Para dosagem de proteínas totais foi adicionado o tampão de diluição (Tris 100 mM, glicerol 40% e azul de bromofenol, pH 6,8) 25:100 (v/v) e β-mercaptoetanol (concentração final 8%) às alíquotas de sobrenadantes das amostras. A dosagem de proteínas foi realizada a partir do método descrito por Peterson (PETERSON, 1977) e através da curva padrão de albumina determinou-se a quantidade de proteínas totais nas amostras.

5.6.3.3 Ensaio de imunoabsorção enzimática

Para detectar os níveis do CDFN através da técnica de ELISA foi utilizado o kit de ELISA sanduíche com duplo anticorpo (SEG458Ra; USCN Life Science, HUB, China), o qual possui especificidade para a proteína CDFN de *Rattus norvegicus*. Diferentemente da detecção dos níveis do CDFN por Western Blotting e imunohistoquímica com o anticorpo policlonal anti-CDFN ab1 (PRS4343, Sigma-Aldrich, MO, EUA), que possui reatividade para detecção da proteína CDFN de roedores e humanos, o imunoconteúdo do CDFN definido com o kit de ELISA determinou apenas os níveis do CDFN do rato (CDFN_r). A técnica foi executada de acordo com as recomendações do fabricante do kit. A placa de microtitulação fornecida no kit era pré-revestida com um anticorpo específico para o CDFN_r e os reagentes e padrões foram preparados conforme as indicações. Inicialmente, adicionou-se 100 µL dos padrões e das amostras aos poços da placa de microtitulação com anticorpo específico para o CDFN_r conjugado à biotina e incubados a 37 °C por 2 h. Em seguida, foi aspirado todo o conteúdo e

adicionado 100 µL do reagente de detecção A (avidina) e incubado a 37 °C por 1 h. Aspirou-se o conteúdo e lavou-se 3 vezes com tampão de lavagem, para então adicionar-se 100 µL do reagente de detecção B (peroxidase HRP) para então incubar-se a 37 °C por 30 min. Novamente lavou-se os poços por 5 vezes e adicionou-se 90 µL do substrato TMB para incubar a 37 °C por 15 min. Os poços com CDNFr exibiram uma mudança de cor e a reação enzima-substrato terminou com a adição de 50 µL da solução de parada (ácido sulfúrico). Os níveis do CDNFr foram determinados utilizando as medidas de absorvância pelo leitor de microplacas *Tecan's Infinite®* (M200; Thermo Fisher Scientific, MA, EUA) com comprimento de onda a 450 nm. Os níveis de CDNFr foram determinados comparando a D.O. das amostras com a curva padrão e pela razão com as quantidades de proteínas totais dosadas nas amostras.

5.7 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA

A análise do perfil de expressão gênica através de conjuntos de dados contidos na literatura, com microarranjos de DNA, foi utilizada com o intuito de reforçar achados obtidos nos modelos experimentais e acrescentar novas informações referentes à modulação na expressão de transcritos de NTFs com atividade sobre neurônios dopaminérgicos (CDNF, GDNF, BDNF e NGF).

5.7.1 Seleção dos conjuntos de dados

A seleção dos conjuntos de dados para análise foi realizada buscando-se por fontes que fornecessem dados de animais discinéticos tratados cronicamente com a L-DOPA; do modelo animal da DP induzido pela 6-OHDA em diferentes tempos pós-lesão; bem como, de pacientes em diferentes estágios da DP. Assim, utilizou-se as seguintes palavras-chave de busca: “*striatum*”, “*substantia nigra*”, “*L-DOPA*”, “*6-OHDA*”, “*Braak*”, “*Parkinson*” e “*Microarray*” (estriado, substância negra, L-DOPA, 6-OHDA, Braak, Parkinson e microarranjo, respectivamente em inglês).

Para localizar os conjuntos de dados de microarranjo de DNA contendo os dados individuais de animais ou pacientes com a DP, utilizou-se duas metodologias de busca distintas. A primeira tratou-se da busca diretamente em repositórios públicos de dados de microarranjo recomendados pelo requerimento MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment* ou informações mínimas sobre um experimento de microarranjo, em inglês): o

Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) e o *ArrayExpress* (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>) (BRAZMA et al., 2001). A segunda envolveu a busca em um banco de dados de resumos, o MEDLINE (*Medical Literature Analysis and Retrieval System Online* ou sistema online de busca e análise de literatura médica, em inglês), utilizando o motor de busca PubMed, para artigos científicos que contivessem no corpo do texto maiores informações sobre os conjuntos de dados recém selecionados na primeira etapa.

Ao final, foram selecionados os conjuntos de dados com condições experimentais que melhor se enquadravam aos questionamentos traçados. Os critérios de inclusão do trabalho foram: estudos contendo amostras de estriado ou SN; amostras de animais tratados cronicamente com a L-DOPA; amostras de modelos animais da DP com a 6-OHDA; pacientes com a DP idiopática; análises realizadas em microarranjo de expressão. Por sua vez, os critérios de exclusão foram: estudos contendo amostras de outros tecidos; amostras de outros modelos animais da DP; amostras de pacientes com outras patologias que não a DP idiopática; análises realizadas em outras tecnologias. Desta forma, três conjuntos de dados foram encontrados e selecionados para análise do perfil de expressão gênica diferencial.

5.7.1.1 Conjunto de dados 1: Dados de animais discinéticos tratados cronicamente com a L-DOPA e lesionados com a 6-OHDA

Conjunto de dados depositado no *Gene Expression Omnibus* (GSE88726) que disponibiliza os transcritos de RNAm de amostras do estriado e da SN de ratos machos Sprague-Dawley, discinéticos e não discinéticos lesionados unilateralmente com a 6-OHDA, apresentando prejuízos em testes da função motora e redução maior do que 90% de DA no estriado conforme mensurado por HPLC. O tratamento crônico com a L-DOPA ocorreu durante 14 dias, após 3,5 semanas de uma lesão e as LIDs foram avaliadas a cada dois dias, totalizando sete avaliações. A comparação foi feita em relação a animais lesionados com a 6-OHDA e não tratados com a L-DOPA.

5.7.1.2 Conjunto de dados 2: Dados de animais lesionados com a 6-OHDA em diferentes tempos pós-lesão

Conjunto de dados depositado no *Gene Expression Omnibus* (GSE58710) que disponibiliza os transcritos de RNAm de amostras da SN de ratos machos Sprague-Dawley

lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no estriado (em dois sítios, 10 µg/sítio) em diferentes tempos pós-lesão (1, 2, 4, 6 e 16 semanas). A lesão foi confirmada com redução de cerca de 99% da DA estriatal e 80% de perda de neurônios dopaminérgicos na SN. A comparação foi feita em relação a animais controles (SHAM da respectiva semana).

5.7.1.3 Conjunto de dados 3: Dados de pacientes com a DP em diferentes estágios segundo Braak

Conjunto de dados depositado no *Gene Expression Omnibus* (GSE49036) que disponibiliza os transcritos de RNAm de amostras da SN de pacientes parkinsonianos em diferentes estágios da doença. Todos os indivíduos foram avaliados neuropatologicamente por especialistas e classificados de acordo com o estadiamento de Braak para a presença da α -sinucleína, em estágios de 0 a 6. Além do estadiamento de Braak para a doença de Alzheimer (emaranhados neurofibrilares; agregados da proteína tau emaranhados e placas β -amiloide), sendo todos esses marcadores foram identificados por imunohistoquímica nas regiões encefálicas. Foram utilizados critérios rigorosos de inclusão e exclusão no estudo, com base no diagnóstico clínico e avaliação patológica abrangente. Pacientes parkinsonianos com padrão de distribuição da α -sinucleinopatia atípico na autópsia foram excluídos, assim como doadores com patologias concomitantes. Apenas pacientes com DP esporádica, com idade de início da doença superior a 45 anos, foram incluídos. Para a análise de expressão gênica diferencial, os pacientes foram agrupados de acordo com os estágios definidos por Braak para a DP, em: 1 e 2 = pacientes com DP leve, 3 e 4 = DP moderada e 5 e 6 = DP grave. A comparação foi feita em relação a indivíduos sem patologias neuropsiquiátricas ou presença da α -sinucleína (estágio de Braak para a DP = 0).

5.7.2 Análise dos dados de microarranjo

A importação e pré-processamento dos conjuntos de dados, bem como a meta-análise de dados de microarranjo para análise diferencial dos transcritos dos NTFs, com: cálculo de tamanhos de efeito individuais, agrupados e médio; cálculo das significâncias estatísticas dos tamanhos de efeito e das variabilidades das distribuições nos tamanhos de efeito estimados, foi realizada conforme descrita por Falchetti, 2019.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m) e a análise estatística adequada à cada situação foi indicada na sessão de resultados. De maneira geral, após assegurar-se da distribuição Normal das amostras através do teste de Shapiro-Wilk, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via ou duas vias (fatorial), conforme número de preditores categóricos (fatores). Para amostras com distribuição Gaussiana em que houve reexposição ao mesmo contexto ou situação, adotou-se a ANOVA de medidas repetidas. Quando evidenciadas diferenças significativas entre os fatores na ANOVA, foi utilizado o teste *post-hoc* de Newman-Keuls ou Tukey para identificar quais dos pares de grupos diferiram diante de comparações múltiplas. Amostras com distribuição não Gaussiana, foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação múltipla de grupos independentes. O teste t de *Student* foi adotado para a comparação de um grupo amostral versus (*vs.*) um valor fixo, entre uma amostra pareada ou entre dois grupos independentes, quando apropriado. Para o cálculo de correlação foi realizada uma regressão linear simples entre as variáveis. A análise da curva de sobrevivência foi a partir do teste de Log-rang (Mantel-Cox) seguido do teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Em todos os testes foi considerado valor de $p < .05$ como indicativo de diferenças significativas. Os resultados foram analisados utilizando o programa STATISTICA® (versão 7.0; StatSoft, OK, EUA) e representados em gráficos confeccionados com o programa GraphPad Prism® (versão 6.0; GraphPad Software, CA, EUA).

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL NEURORESTAURADOR DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DO CDFN

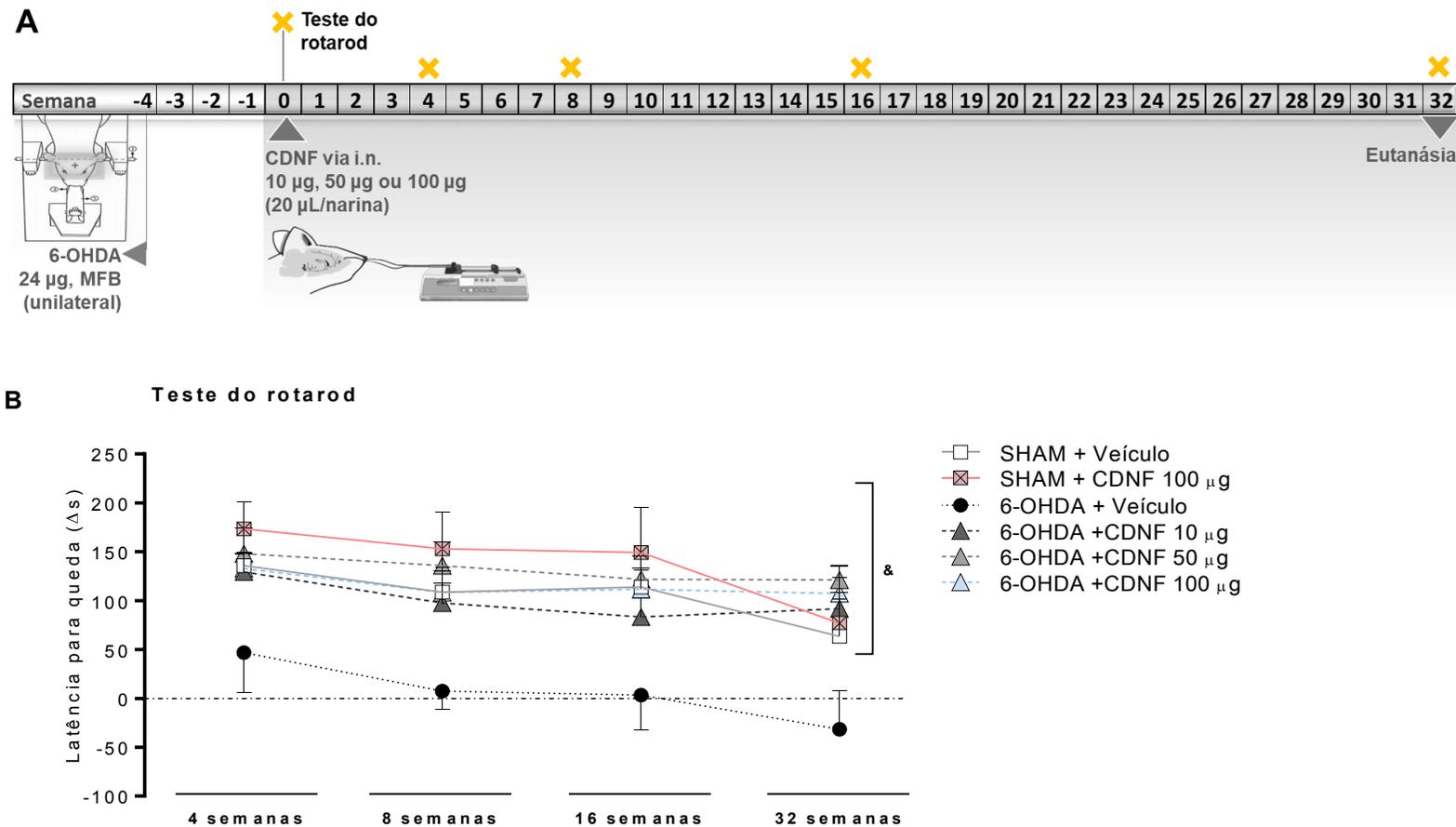
6.1.1 Efeitos da administração i.n. do CDFN sobre parâmetros da função motora

6.1.1.1 Administração i.n. do CDFN (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função motora, avaliados a curto, médio e longo prazo no teste do rotarod e teste do cilindro em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Os parâmetros de marcha, coordenação inter-membros e equilíbrio foram avaliados através do teste do rotarod durante 32 semanas após a administração i.n. do CDFN (**Figura13A**). Os resultados do rotarod encontram-se representados como um delta da variação entre o desempenho motor dos animais nas semanas pós-administração i.n. para aquele apresentado na sessão de avaliação basal (**Figura13B**). A ANOVA de uma via indicou ausência de diferenças estatísticas no desempenho motor dos animais na sessão basal ($F_{1,5} = 0.99$, $p = ns$; média geral = 132 ± 9 s), assim como ausência de diferenças significativas no número de quedas durante a fase estacionária e durante o treino com rotações fixas em 5 rpm, independente do tratamento ($P > .05$). Nas sessões de teste pós-administração i.n., os valores de delta foram analisados a partir do teste t de *Student*, tornando evidente a melhora no desempenho motor dos animais SHAM + veículo em todos os tempos avaliados quando comparado ao seu desempenho basal ($t_{10} = 4.28 - 9.79$, $p \leq .001$ vs. valor de referência). Diferentemente do perfil visualizado para os animais controles, o teste t de *Student* evidenciou um prejuízo de coordenação e equilíbrio nos animais lesionados com a 6-OHDA + veículo ($t_{6,7} = -0.08 - 1.15$, $p > .05$ vs. valor de referência).

Neste contexto, o CDFN administrado por via i.n. foi capaz de reverter o prejuízo causado pela 6-OHDA em todas as doses testadas (10, 50 e 100 µg), este efeito teve magnitude semelhante ao exibido pelos animais SHAM e manteve-se durante todo o protocolo de avaliação ($t_{5-10} = 3.75 - 9.79$, $p < .001$ vs. valor de referência). A ANOVA de medidas repetidas indicou uma diferença significativa no fator tratamento ($F_{1,5} = 3.79$, $p < .01$), segundo o teste *post-hoc* de Newman-Keuls o grupo 6-OHDA + veículo apresenta, de fato, tempos significativamente menores de latência para queda em relação aos demais grupos ($p \leq .01$).

Figura 13: Efeito da administração intranasal do CDFN sobre parâmetros de coordenação motora e equilíbrio em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.

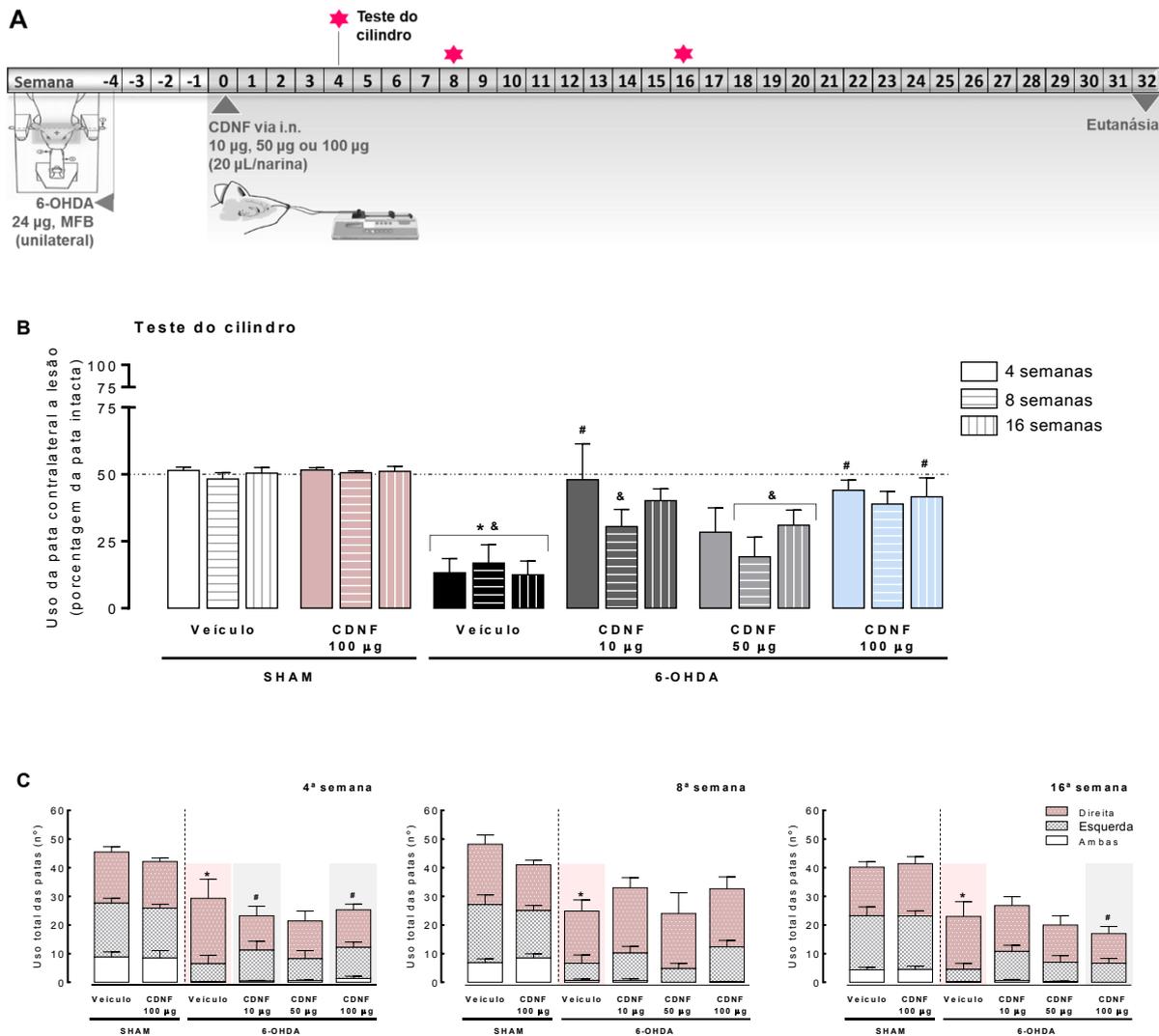


Legenda: (A) Desenho experimental indicando as semanas de realização do teste do rotarod; (B) o parâmetro de latência para a queda é demonstrado em razão do desempenho basal (semana 0). Os dados são expressos como média \pm e.p.m. ($n = 6-10/\text{grupo}$); $&p \leq .05$ vs. o valor de referência. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e teste t de *Student* em relação a um valor de referência = 0. Os símbolos representam a semana e frequência de repetição do respectivo teste ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

A manutenção do efeito do CDNF administrado via i.n. foi também avaliada em um paradigma que permite a observação da simetria no uso das patas dianteiras, o teste do cilindro, realizado nas semanas 4, 8 e 16 após o protocolo de administração i.n. (**Figura14A**). Comparando a porcentagem de uso da pata contralateral à lesão (pata lesionada) ao valor referencial de 50 (porcentagem esperada caso houvesse equidade no uso das patas dianteiras), a análise estatística a partir do teste t de *Student* demonstrou que os animais do grupo 6-OHDA + veículo apresentaram uma redução significativa no uso da pata lesionada ($t_5 = -7.37 - -4.87$, $p < .005$ vs. valor de referência) (**Figura14B**). Tal prejuízo, ocorreu de forma sustentada, com médias de uso da pata lesionada não ultrapassando 20% no decorrer das semanas pós-administração i.n. (13.2, 16.9 e 12.5%, referente às semanas 4, 8 e 16, respectivamente). Além disso, a porcentagem de encosto com a pata contralateral à lesão do grupo 6-OHDA + veículo foi significativamente menor do que a porcentagem de encostos contralaterais apresentada pelos animais SHAM ($M \approx 50\%$, referente às semanas 4, 8 e 16), como indicado pela ANOVA de medidas repetidas ($F_{5,33} = 17.21$, $p < .0001$) e teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($p < .05$).

O perfil demonstrado pelos animais SHAM, de paridade no uso das patas dianteiras, foi igualmente observado em animais tratados com a maior dose do CDNF via i.n. (100 μg), onde o prejuízo causado pela lesão unilateral com a 6-OHDA no teste do cilindro foi totalmente revertido pela administração i.n. do CDNF. Já as menores doses do CDNF i.n. (10 e 50 μg), demonstraram um potencial de reversão parcial do prejuízo causado pela 6-OHDA, evidenciado especialmente a curto prazo e para a dose de 10 μg ($t_4 = -3.02, -4.21$ e -3.35 , $p < .05$ vs. valor de referência, respectivamente para a dose de 10 μg na semana 8 e para a dose de 50 μg nas semanas 8 e 16). Na **Figura14C**, tais resultados podem ser visualizados quanto ao total de apoios com cada uma das patas na parede do cilindro, tornando ainda mais claro o viés de lateralidade presente no grupo 6-OHDA + veículo. Adicionalmente, os dados do número total de apoios na parede do cilindro indicam um maior uso de ambas as patas (concomitantemente) nos animais SHAM em relação aos lesionados com 6-OHDA, parâmetro este que não foi modificado pela utilização do CDNF i.n., como demonstrado pela ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls ($F_{5,33} = 6.78, 7.49$ e 11.77 , $p < .05$, para 4^a, 8^a e 16^a semana, respectivamente).

Figura 14: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o parâmetro de assimetria motora em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



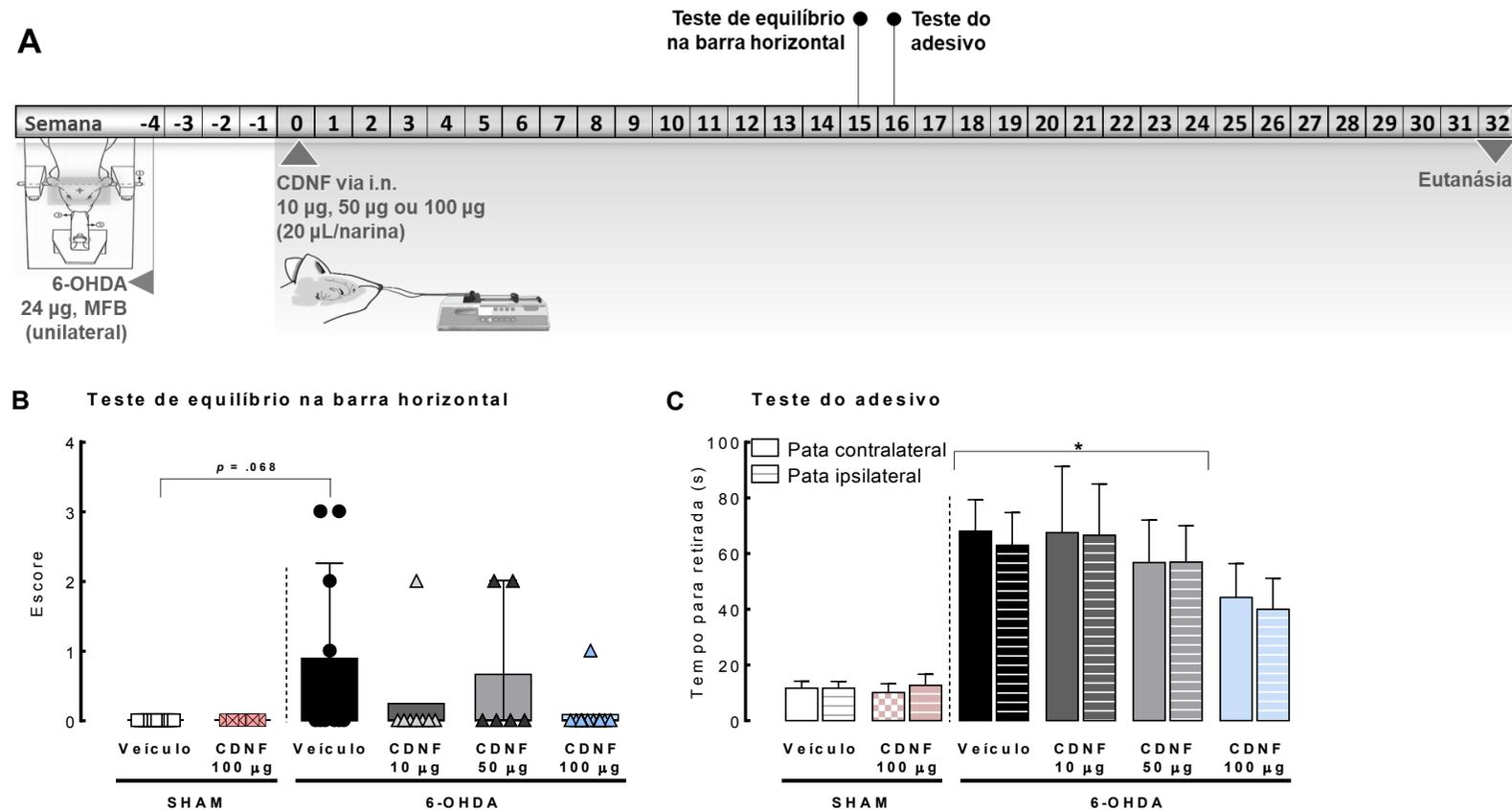
Legenda: (A) Desenho experimental indicando as semanas de realização do teste do cilindro; (B) o viés de assimetria observado em decorrência da lesão unilateral com a 6-OHDA foi avaliado através do teste do cilindro, onde o (C) número total de toques realizado com cada uma das patas anteriores a base para o cálculo da porcentagem de uso da pata contralateral à lesão. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. ($n = 6-10/\text{grupo}$); $*p \leq .05$ vs. SHAM + veículo; $\#p \leq .05$ vs. 6-OHDA + veículo (no mesmo tempo referido) e $\&p \leq .05$ vs. valor fixo (B). (C) ANOVA de uma via, (B) ANOVA de medidas repetidas, ambas seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e (B) teste t de *Student* em relação a um valor fixo = 50. Os símbolos representam a semana e frequência de repetição do respectivo teste ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.1.1.2 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função motora, avaliados a médio prazo no teste de equilíbrio na trave horizontal, teste do adesivo e teste do campo aberto em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

O êxito do CDNF i.n. em preservar a capacidade motora dos animais lesionados com a 6-OHDA foi verificado através de outros três testes entre o primeiro e segundo trimestre do protocolo de administração i.n., cada qual com uma função singular (**Figura15** e **Figura16A**). O teste de equilíbrio na barra horizontal fornece medidas sobre estabilidade e balanço, deste modo, podemos atribuir aos animais lesionados com 6-OHDA uma tendência à instabilidade estática e risco de quedas como visto na **Figura15B** e indicado pelo teste para medidas não paramétricas Kruskal-Wallis $H(5) = 10.28, p = .0677$. Em especial, o tratamento com a maior dose de CDNF i.n. (100 µg) apresentou $M_a = 1$, o que representa um número de quedas três vezes menor do que o grupo 6-OHDA + veículo ($M_a = 4$), de fato, o grupo tratado com a dose de 100 µg do CDNF via i.n. demonstrou uma postura semelhante ao grupo SHAM, onde não houveram quedas da barra horizontal ($M_a = 0$). Novamente, os animais tratados com as menores doses de CDNF i.n. tiveram um desempenho intermediário aos animais controle e lesionados com a 6-OHDA ($M_a = 1$ e 2, respectivamente para 10 e 50 µg de CDNF i.n.).

Retomando a sequência temporal dos testes comportamentais motores, temos a visualização do teste do adesivo como parâmetro de competência motora fina na 16ª semana pós-administração do CDNF i.n. (**Figura15C**). A ANOVA de uma via indicou uma diferença entre os grupos ($F_{5,40} = 3.91$ e $3.54, p < .01$, respectivamente para pata esquerda e direita) e o teste post-hoc de Newman Keuls revelou um déficit na habilidade motora fina em decorrência da lesão no grupo 6-OHDA + veículo em comparação ao grupo SHAM + veículo ($p < .05$); sendo o comprometimento de ambas as patas, como indicado pelo teste t de *Student* para amostras independentes ($t_{14} = -0.31, p > .05$, contralateral vs. ipsilateral à lesão). Em relação ao efeito do CDNF i.n., a ANOVA de uma via seguida do *post-hoc* de Newman Keuls indicou que os animais lesionados e tratados com 100 µg do CDNF apresentaram desempenho estatisticamente igual àqueles não lesionados ($p > .05$) para o tempo de retirada do adesivo.

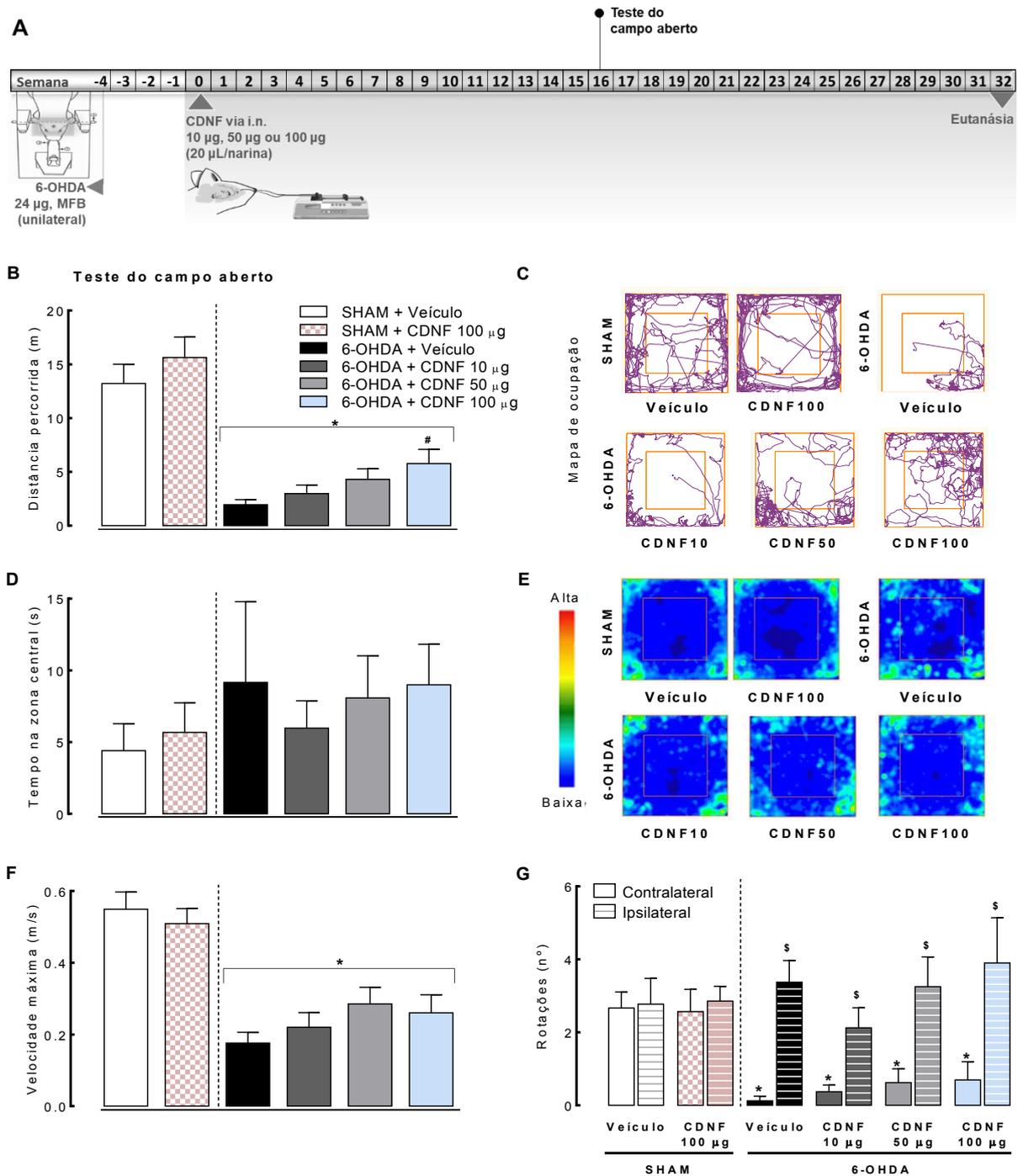
Figura 15: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre parâmetros de equilíbrio e coordenação motora fina em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental indicando a semana de realização do teste de equilíbrio na barra horizontal e do teste do adesivo; (B) o teste de equilíbrio na barra horizontal, realizado 15 semanas após a administração de CDNF por via i.n., forneceu subsídios para a visualização do perfil postural dos animais sobre uma situação que exige equilíbrio e balanço; (C) enquanto o teste do adesivo realizado na 16ª após a administração i.n. do CDNF avaliou a competência motora fina dos animais. Os dados são expressos como média \pm e.p.m. [exclusivamente em (B), os dados também estão representados como mediana \pm intervalo interquartil] ($n = 6-10/\text{grupo}$); $*p \leq .05$ vs. SHAM + veículo. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (C); teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (B) e teste t de *Student* não-pareado (C). MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

O teste do campo aberto, realizado 16 semanas após o protocolo de administração i.n., revelou que os animais lesionados com a 6-OHDA apresentavam uma redução na atividade locomotora espontânea, como evidenciado através da ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls ($F_{5,44} = 17.39, p < .0001$), sendo as duas menores doses de CDNF i.n. incapazes de reverter esse prejuízo (**Figura16B/C**). Contudo, quando comparada a distância total percorrida no campo aberto entre os animais lesionados apenas, evidenciou-se um efeito positivo do CDNF i.n. 100 µg, aumentando a atividade locomotora dos animais ($F_{3,30} = 2.85, p < .05$). Quanto ao tempo despendido na zona central, não foram vistas diferenças significativas capazes de se relacionar à perfis ansiogênicos ($F_{5,41} = 0.45, p = ns$) (**Figura16D/E**). Por fim, a redução da velocidade máxima ($F_{5,44} = 12.15, p < .001$) e nas rotações contralaterais à lesão (indicando a dificuldade de iniciar-se o movimento pelo lado lesionado) ($F_{5,44} = 7.37, p \leq .05$; $t_{14-18} = -2.39 - -24.5, p < .05$ rotações ipsilaterais vs. contralaterais) em animais 6-OHDA, não foram revertidas pela administração do CDNF i.n. (**Figura16F e G**, respectivamente).

Figura 16: Efeito da administração intranasal do CDFN sobre parâmetros da atividade locomotora espontânea em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental indicando a semana de realização do teste do campo aberto; (B) na 16ª após a administração i.n. avaliou-se a deambulação dos animais a partir do teste do campo aberto (B - G). Além da (B) distância total percorrida e a demonstração dos (C) trajetos percorridos; parâmetros adicionais foram explorados no teste do campo aberto, como (D) tempo e (E) permanência na zona central do aparato, (F) velocidade máxima atingida e (G) número de rotações espontâneas. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 6-10/grupo); * $p \leq .05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq .05$ vs. 6-OHDA + veículo e \$ $p \leq .05$ vs. o lado contralateral. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (B, D, F e G) e teste t de *Student* não-pareado (G). MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

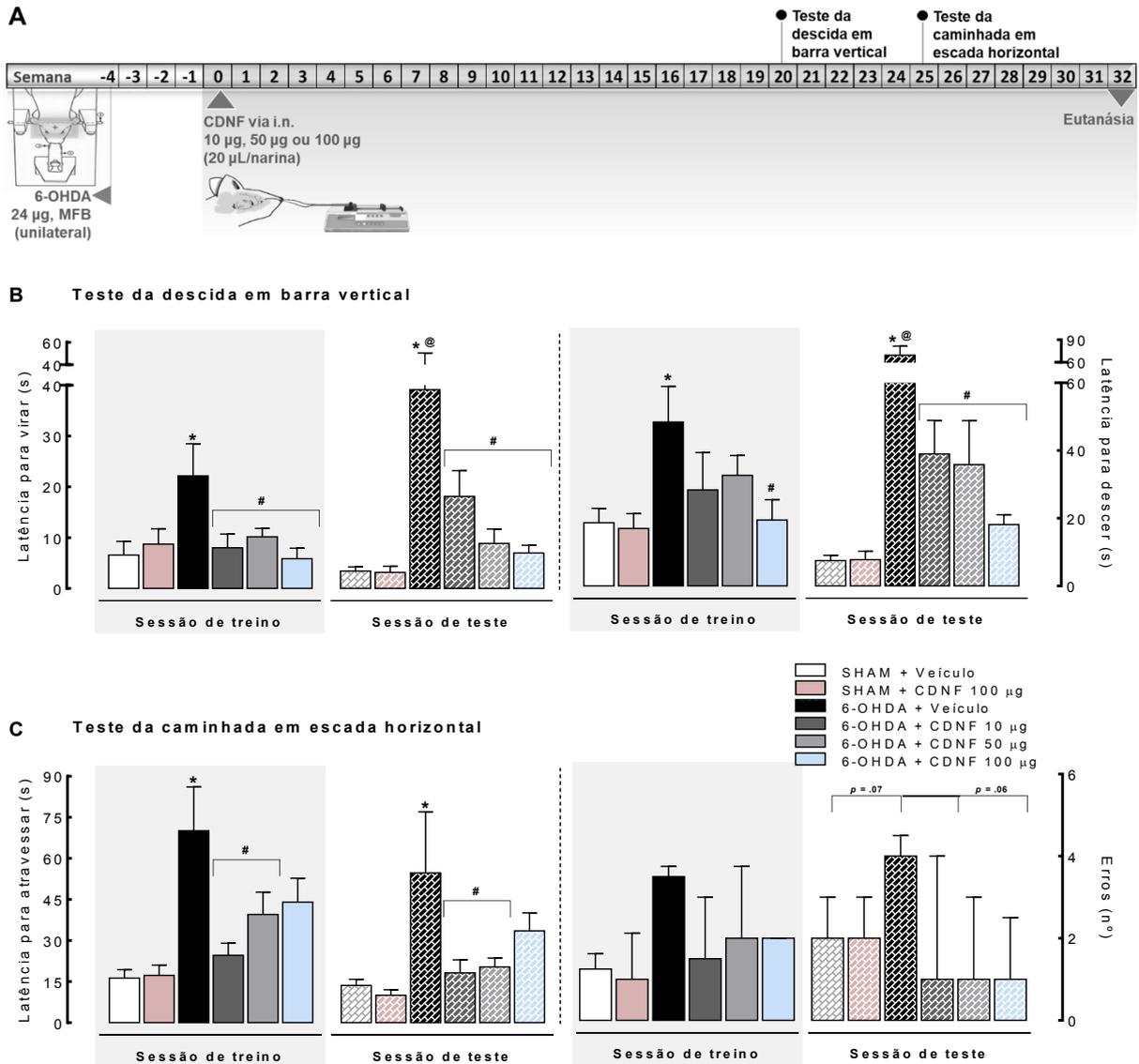
6.1.1.3 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função motora, avaliados a longo prazo no teste da descida em barra vertical, teste da caminhada em escada horizontal e teste da passada em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Após meses da administração i.n. de CDNF, prosseguiu-se com a avaliação do seu efeito sobre a função motora de animais lesionados com 6-OHDA no MFB. Dentre os testes planejados para a fase final do protocolo, temos: o teste de descida em barra vertical, o teste da caminhada em escada horizontal e o teste da passada, executados, respectivamente, na 20^a, 25^a e 30^a semana pós-CDNF i.n. (**Figura17** e **Figura18A**). Esse delineamento foi articulado de modo a certificar-se da manutenção do efeito do CDNF administrado via i.n. sobre habilidades motoras já mencionadas e caracterizadas quanto à sua relevância no atual contexto.

O teste da descida em barra vertical objetiva avaliar, além da coordenação motora, a bradicinesia dos animais. Os resultados provenientes deste teste demonstram um importante comprometimento de coordenação com presença de bradicinesia no grupo 6-OHDA + veículo, como visto pela ANOVA de medidas repetidas nos tempos de viragem ($F_{5,31} = 9.02, p < .0001$) e de descida ($F_{5,31} = 13.07, p < .0001$) dos animais da barra, seguido do teste *post-hoc* de Newman Keuls nas sessões de treino e teste ($p < .05$ vs. SHAM + veículo) (**Figura17B**). O tratamento com CDNF i.n. reverteu tais prejuízos em ambos os parâmetros, sobretudo na sessão de teste com as três doses testadas (10, 50 e 100 µg, $p > .05$ vs. 6-OHDA + veículo), ficando claro seu efeito em mais uma vez restabelecer déficits funcionais dessa natureza.

Como no teste da descida em barra vertical, o teste da caminhada em escada horizontal avalia um segundo parâmetro além de equilíbrio e coordenação motora, no caso, a marcha dos animais através da travessia pelo aparato. A latência para atravessar a escada horizontal demonstrou modificada diante da lesão com a 6-OHDA, como indicado pela ANOVA de medidas repetidas ($F_{5,31} = 13.07, p < .0001$) e teste *post-hoc* de Newman Keuls ($p < .05$ vs. SHAM + veículo); assim como, sensível ao efeito do CDNF i.n., que foi capaz de reverter tal prejuízo nas sessões de treino e teste (dose de 10 e 50 µg, $p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo) (**Figura17C**). Quanto ao número de erros cometidos no posicionamento das patas durante a travessia pela escada, a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis revelou uma tendência a um maior número de erros do grupo 6-OHDA + veículo ($M_a = 4$) em comparação aos animais controles ($M_a = 2$) na sessão de teste, com redução do prejuízo diante do tratamento com as doses de 50 e 100 µg de CDNF i.n. ($M_a = 2$ e 1, respectivamente).

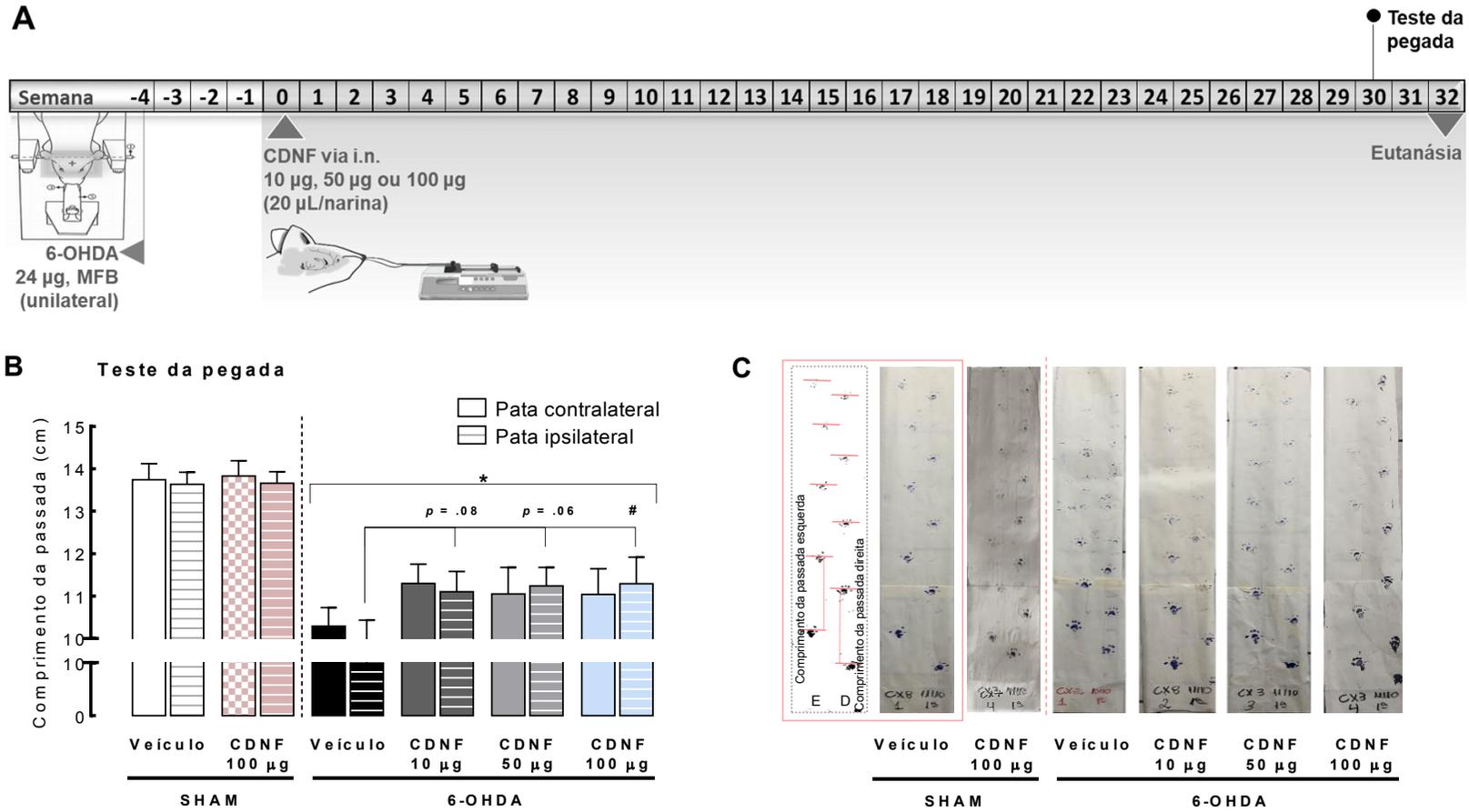
Figura 17: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre parâmetros de coordenação e equilíbrio, bradicinesia e marcha em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental indicando as semanas de realização do teste da descida em barra vertical e do teste da caminhada em escada horizontal; (B) o teste de descida em barra vertical, realizado na 20ª semana após o protocolo de administração i.n., avaliou questões de equilíbrio e bradicinesia sobre os parâmetros de latência para viragem no poste (eixo Y esquerdo do gráfico) e tempo total para descida do poste (eixo Y direito do gráfico); (B) o teste da caminhada em escada horizontal, realizado na 25ª semana pós-administração i.n., avaliou a coordenação e habilidades motoras finas para execução marcha sobre os parâmetros de latência para atravessar o aparato (eixo Y esquerdo do gráfico) e número total de passos falhos no teste (eixo Y direito do gráfico). Os dados são expressos como média ± e.p.m. [exclusivamente em (C, eixo Y direito do gráfico), os dados estão representados como mediana ± intervalo interquartil] (n = 6-10/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo, @ $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo (na sessão anterior) e # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo (na mesma sessão). ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls (B e C) e teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (C, eixo Y direito do gráfico). MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

Apesar de o teste da caminhada em escada horizontal fornecer indícios sobre o padrão de marcha dos animais, a avaliação mais comumente empregada para este fim se dá através do teste da pegada, o qual foi utilizado ao final do presente protocolo (30ª semana) de administração i.n. do CDNF em animais lesionados com 6-OHDA no MFB. Como indicado pela ANOVA de uma via, houve alteração no comprimento da passada dos animais em decorrência dos diferentes tratamentos ($F_{5,44} = 9.40 - 10.27, p < .0001$, respectivamente para a pata contralateral e ipsilateral à lesão) e o teste *post-hoc* de Newman Keuls demonstrou que essa diferença corresponde a um encurtamento na passada dos animais lesionados com 6-OHDA ($p < .0001$ vs. SHAM + veículo, para ambos os eixos). No entanto, em especial para o lado ipsilateral à lesão, a administração i.n. do CDNF, doses de 10 e 50 µg, foi capaz de reverter parcialmente o dano causado pela lesão com 6-OHDA ($p = .08$ e $p = .06$ vs. 6-OHDA + veículo, respectivamente) ou totalmente com a utilização da maior dose de CDNF i.n. testada, 100 µg ($p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo) (**Figura18B**). Ademais, como pode ser visto na imagem representativa a partir da impressão dos padrões de marcha dos grupos experimentais (**Figura18C**), visivelmente têm-se distinções também na orientação e direção das passadas dos animais 6-OHDA + veículo em relação aos lesionados e tratados com o CDNF i.n., de forma a contribuir para a modificação global na marcha e prejuízo motor evidenciado.

Figura 18: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a marcha em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental indicando as semanas de realização do teste da pegada; (B) que avaliou o perfil de marcha dos animais através do comprimento de suas passadas, visualizadas em (C). Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 6-10/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo e # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo (para a mesma pata). ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

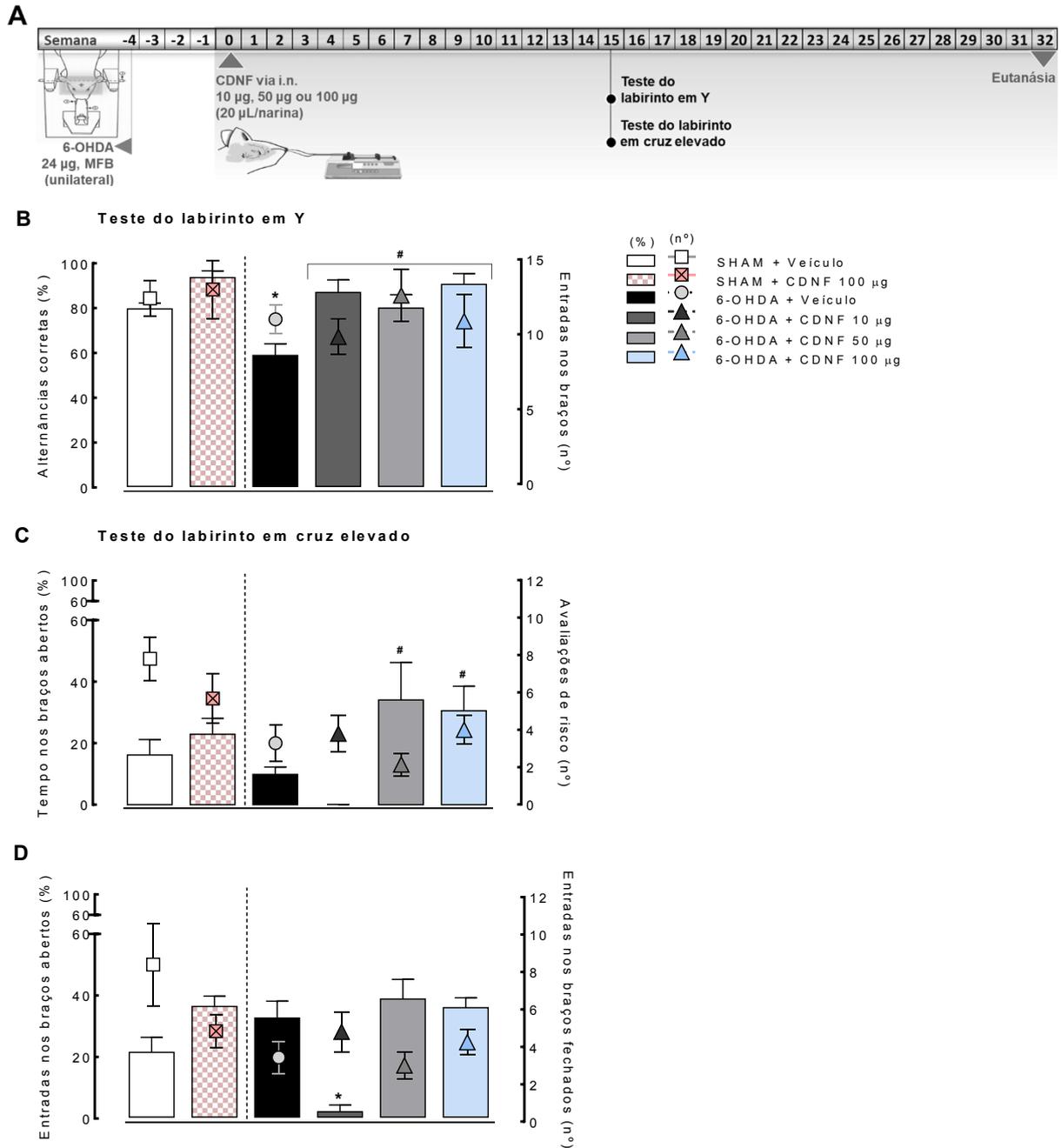
6.1.2 Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre parâmetros da função não motora

6.1.2.1 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função não motora, avaliados a médio prazo no teste do labirinto em Y e teste do labirinto em cruz elevado em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Além da extensa avaliação da função motora, foi testado o efeito da administração i.n. do CDNF em parâmetros não motores, com relação à cognição e emocionalidade. O teste de alternância espontânea no labirinto em Y, realizado 15 semanas após o protocolo de administração i.n., permitiu o acesso à memória operacional espacial de curto prazo (**Figura19A**). No teste foi observado um importante prejuízo cognitivo nos animais lesionados com a 6-OHDA + veículo, como demonstrado pela ANOVA de uma via ($F_{5,36} = 7.71, p < .0001$) seguido do teste *post-hoc* de Newman Keuls ($p < .05$ vs. SHAM + veículo). Além disso, a análise demonstrou que tal detrimento cognitivo foi revertido pela administração i.n. do CDNF em todas as doses (10, 50 e 100 µg, $p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo); a porcentagem de alternâncias corretas passou de cerca de 60 % para níveis próximos ao controle – 80% (**Figura19B**, eixo Y esquerdo do gráfico B). Por fim, o número de entradas nos braços fechados, empregado como índice de atividade locomotora, não diferiu entre os grupos como visto através da análise não paramétrica de Kruskal-Wallis $H(5) = 3.63, p = .6031$ (**Figura19B**, eixo Y direito do gráfico B).

No teste do labirinto em cruz elevado o parâmetro de porcentagem de tempo nos braços abertos nos permite considerar um efeito ansiolítico do CDNF i.n. nas doses 50 e 100 µg em relação aos animais lesionados com a 6-OHDA + veículo, também após 15 semanas do protocolo de administração i.n., como demonstrado pela ANOVA de uma via ($F_{5,32} = 2.89, p < .05$) e teste *post-hoc* de Newman Keuls (50 e 100 µg, $p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo) (**Figura19C**, eixo Y esquerdo do gráfico). Os parâmetros de número de avaliações de risco (**Figura19C**, eixo Y direito do gráfico) e porcentagem de entradas nos braços abertos (**Figura19D**, eixo Y esquerdo do gráfico) não apresentaram diferenças significativas relevantes entre os tratamentos ($p < .05$ vs. SHAM + veículo para o grupo 6-OHDA + CDNF 50 µg no nº de avaliações de risco e para o grupo 6-OHDA + CDNF 10 µg na % de entradas nos braços abertos). Ainda, a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis revelou que não houve diferença entre os grupos no número de entradas nos braços fechados [$H(5) = 7.55, p = .1825$], validando o teste quanto a questões de mobilidade (**Figura19D**, eixo Y direito do gráfico).

Figura 19: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a função não motora em parâmetros cognitivos e do estado ansioso em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.

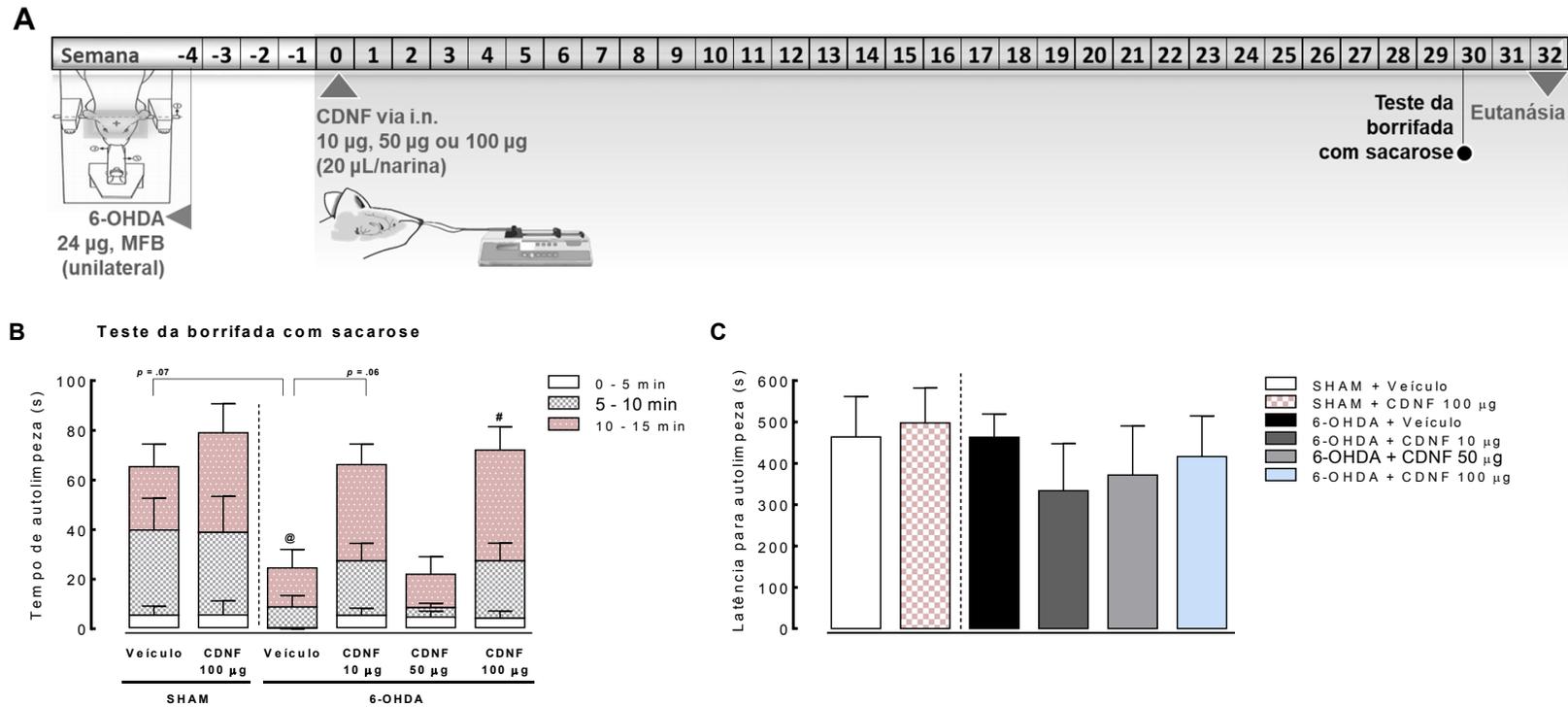


(para as barras) e teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido do teste *post-hoc* de Dunn (para os símbolos). MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.1.2.2 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e parâmetros da função não motora, avaliados a longo prazo no teste da borrifada com sacarose em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Na caracterização do estado hedônico o teste da borrifada com sacarose, realizado após 30 semanas do protocolo de administração i.n., forneceu os índices de autocuidado e comportamento motivacional em animais lesionados com 6-OHDA no MFB e tratados com o CDNF i.n. (**Figura20A**). A análise estatística a partir da ANOVA de uma via indicou uma diferença para o fator tratamento no parâmetro de tempo total de autolimpeza ($F_{5,30} = 2.56, p < .05$), o teste *post-hoc* de Newman Keuls, realizado em sequência, revelou uma tendência ao comportamento do tipo-anedônico em animais lesionados com a 6-OHDA + veículo ($p = .07$ vs. SHAM + veículo, $p \leq .05$ vs. SHAM + CDNF 100 µg) (**Figura20B**). Nesse contexto, o tratamento com CDNF i.n., especialmente a dose de 100 µg, apresentou substancial melhora ($p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo) aos animais, com tempo médio do comportamento de autocuidado passando de 25s em animais lesionados apenas para 72s diante do tratamento com CDNF 100 µg. O parâmetro de latência para o comportamento de autolimpeza não foi modificado perante os diferentes tratamentos ($F_{5,30} = 0.40, p = ns$) (**Figura20C**).

Figura 20: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre a função não motora de estado hedônico em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



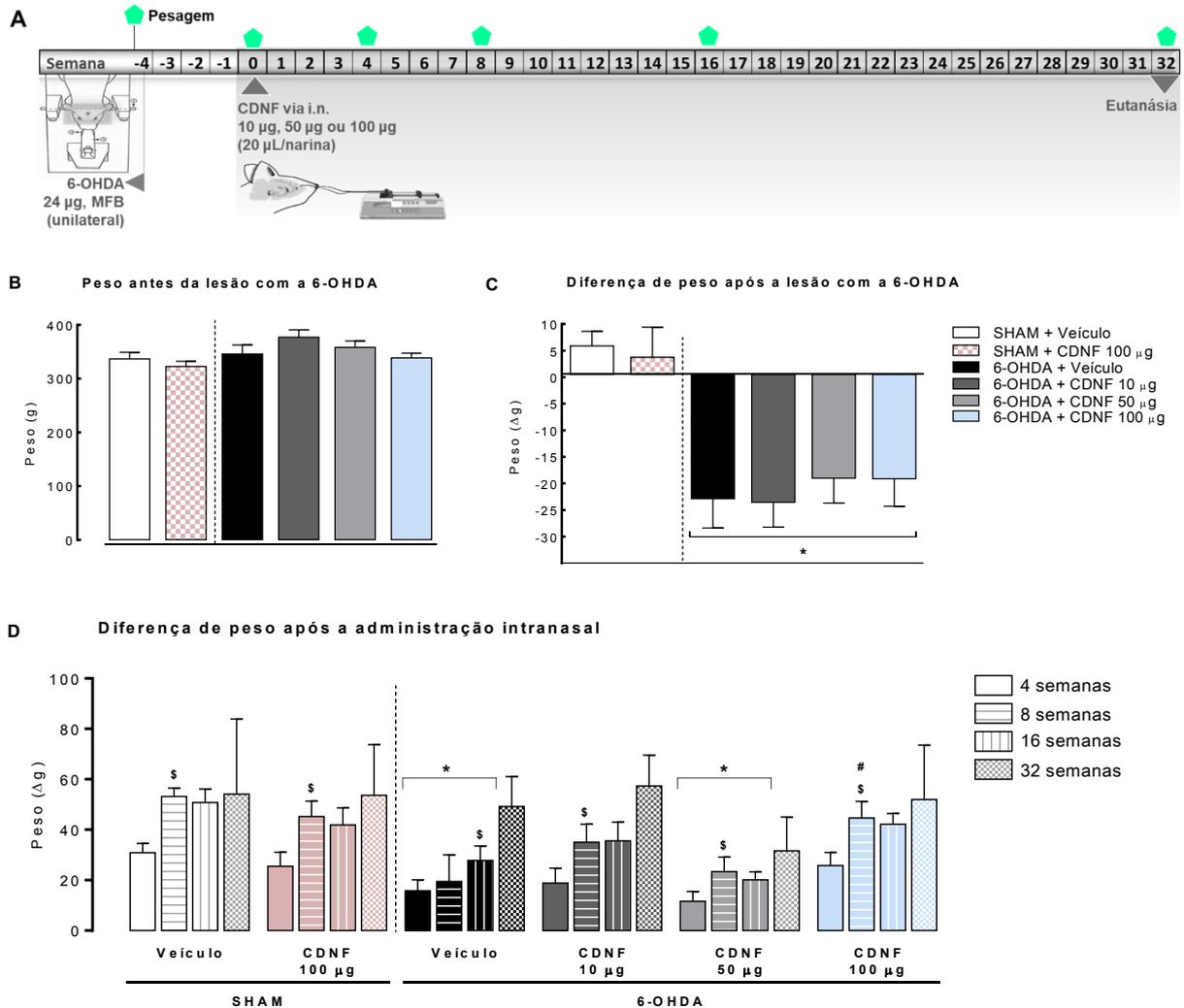
Legenda: (A) Desenho experimental indicando a semana de realização do teste da borrifada com sacarose; (B e C) o teste da borrifada com sacarose foi realizado 30 semanas após o protocolo de administração i.n., (B) as medidas de tempo realizando o comportamento de autolimpeza (C) e latência para o início de tal comportamento, fornecem subsídios para a avaliação do estado hedônico e motivacional. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 6-10/grupo); @ $p \leq 0,05$ vs. SHAM + CDNF 100 µg; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.1.3 Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre o bem-estar geral dos animais

6.1.3.1 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e o peso corporal, avaliado a curto, médio e longo prazo em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

O peso corporal dos animais foi acompanhado durante todo o protocolo de administração i.n. do CDNF em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, a iniciar pelo controle de peso previamente à cirurgia, onde a ANOVA de uma via indicou ausência de diferenças no peso dos animais ($F_{5,48} = 2.25, p > .05$) (**Figura21A**). Passadas 4 semanas da lesão, previamente ao protocolo de administração intranasal, os animais foram novamente pesados e observa-se que animais lesionados com a 6-OHDA no MFB apresentaram uma redução de peso bastante, como visto na **Figura21B** e ANOVA de uma via ($F_{5,48} = 8.39, p < .0001$) seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls ($p < .005$ vs. SHAM + veículo). Após a administração i.n. do CDNF, os animais apresentaram em ganho de peso em decorrência do desenvolvimento, como demonstrado na **Figura21C** e ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls, que indicou diferenças significativas para o fator tempo/repetição com ganho de peso ao longo do tempo ($F_{3,75} = 5.47, p < .005$). No entanto, enquanto animais controle vinham apresentando ganho de peso normal nas semanas 4, 8, 16 e 32 pós-administração i.n., aqueles do grupo 6-OHDA + veículo apresentaram perfil semelhante somente ao final do protocolo (32ª semana pós-administração i.n.: $\Delta g M = 54.1$ para o grupo SHAM + veículo vs. 49.2g do grupo 6-OHDA + veículo), sendo o ganho de peso nos meses antecedentes significativamente menor ($p < .05$). A reversão desse quadro pôde ser observada perante a administração do CDNF i.n. nas doses de 10 ou 100 µg, onde o ganho de peso de tais animais foi semelhante ao dos animais controle: com progressão gradual da 4ª para 8ª semana após o tratamento e subsequente estabilização do peso corporal.

Figura 21: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o peso corporal em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.

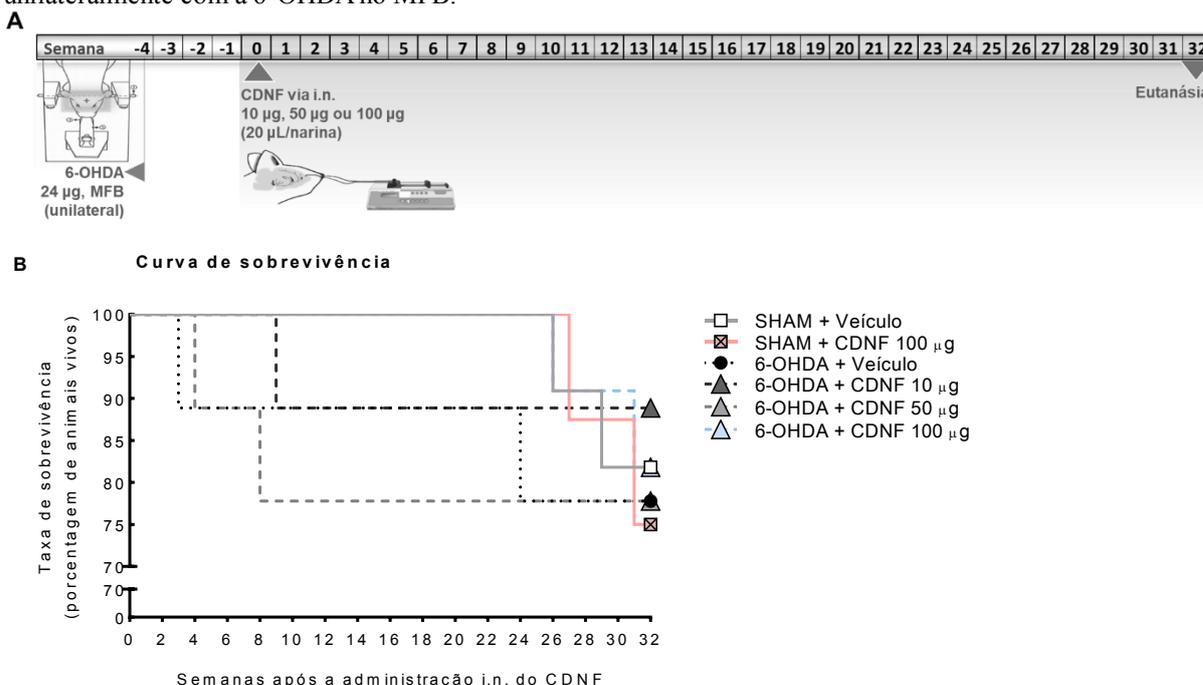


Legenda: (A) Desenho experimental indicando as semanas de pesagem dos animais. (B) Inicialmente fez-se a pesagem dos animais no dia de realização da cirurgia estereotáxica para lesão com a 6-OHDA no MFB, a fim de verificar se não haveriam modificações basais no peso dos animais intergrupos; (C) a diferença desta para quatro semanas após, antes da administração do CDNF i.n. é representada como um delta da variação de peso. (D) As avaliações sequenciais de ganho de peso são demonstradas para os tempos de 4, 8, 16 e 32 semanas após a administração de CDNF i.n., o delta neste caso é em relação à aferição realizada antes da administração do CDNF i.n.. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 6-10/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo (* e # indicam diferença nos mesmos tempos referidos, quando for o caso) e $p \leq 0,05$ vs. 4ª semana para o mesmo grupo. ANOVA de uma via (B e C) e ANOVA de medidas repetidas (D) ambas seguidas do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Os símbolos representam a semana e frequência de repetição da pesagem corporal dos animais. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.1.3.2 Administração i.n. do CDFN (10, 50 e 100 µg) e a sobrevivência de ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

O número de óbitos foi registrado no transcorrer de 32 semanas do protocolo experimental para avaliação do efeito da administração i.n. do CDFN em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB (**Figura22A**). Durante os 8 meses subsequentes à administração i.n., ocorreram óbitos nos diferentes grupos que foram registrados para posterior montagem da curva de sobrevivência, que pode ser observada na **Figura22B**. O número total de óbitos por grupo experimental foi de 2 animais, com exceção do grupo 6-OHDA + CDFN 10 µg, que apresentou apenas 1 óbito durante todo o protocolo (as diferenças nas porcentagens ao final das 32 semanas diz respeito a variação no número inicial de animais/grupo). Assim, a análise estatística de Log-rang (Mantel-Cox) seguido do teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon comparou a porcentagem de sobrevivência no decorrer do tempo e demonstrou não haverem diferenças significativas em decorrência da lesão com a 6-OHDA ou do tratamento i.n. com o CDFN [$\chi^2(5, 57) = 0.69$ e 0.0002 , $p = ns$, respectivamente].

Figura 22: Efeito da administração intranasal do CDFN sobre a sobrevivência de animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



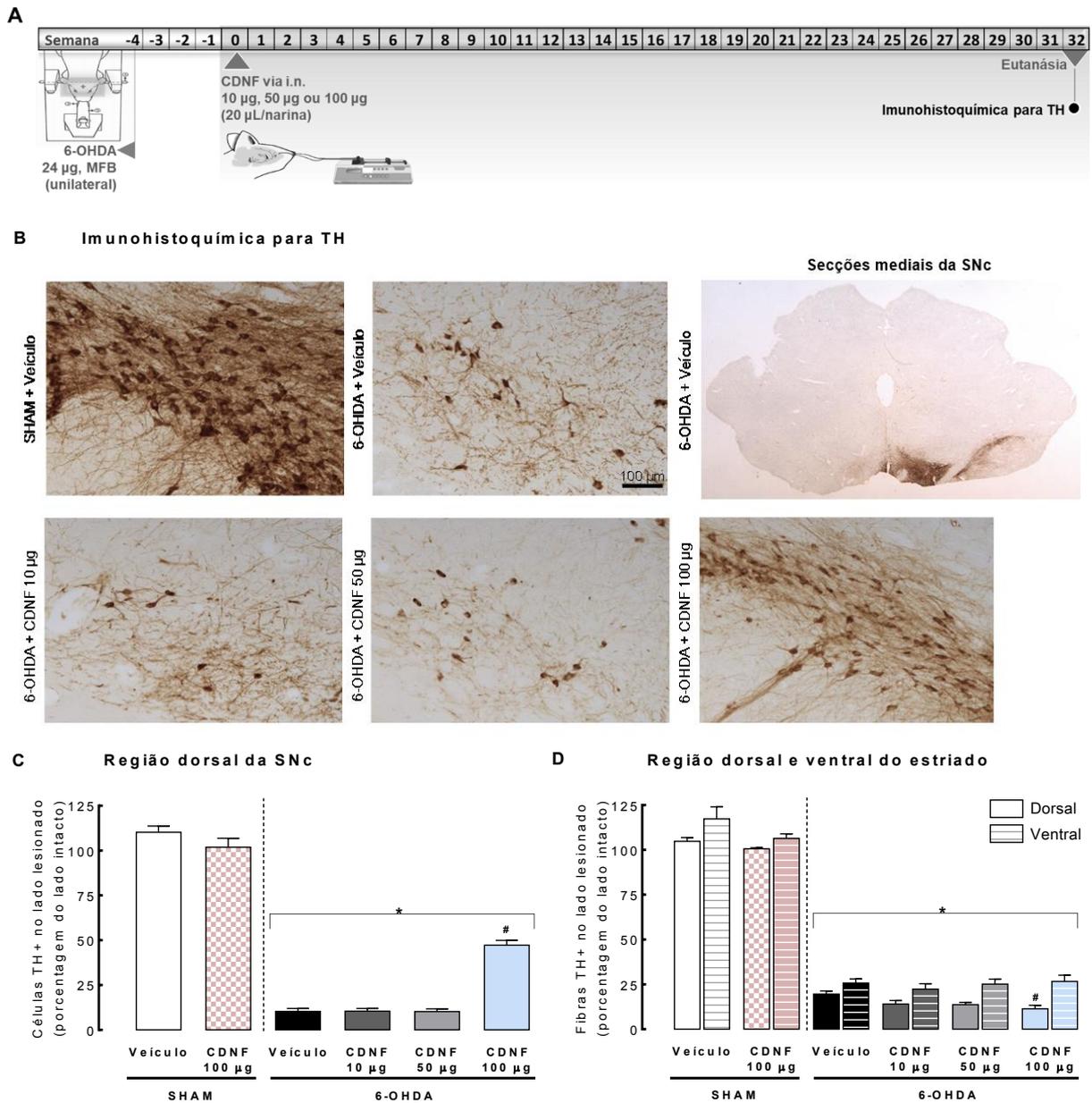
Legenda: (A) Desenho experimental onde foi avaliado a taxa de sobrevivência dos animais. (B) Curva de sobrevivência realizada a partir da porcentagem de animais vivos no transcorrer das 32 semanas seguidas à administração i.n. do CDFN. Log-rang (Mantel-Cox) seguido do teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.1.4 Efeitos da administração i.n. do CDNF sobre a degeneração dopaminérgica

6.1.4.1 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e a marcação para TH através da técnica de imunohistoquímica no estriado e na SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

A fim de avaliar o grau de degeneração na via dopaminérgica nigroestriatal, 8 meses após a administração i.n. foi mensurado a imunomarcção de células positivas para a enzima TH (usado como marcador de neurônios dopaminérgicos) na SN e no estriado (**Figura23A**). Desta forma, utilizando a técnica de imunohistoquímica para imunodeteção da TH, evidenciou-se uma extensa lesão causada pela 6-OHDA injetada unilateralmente no MFB, a ANOVA de uma via seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey HSD indicou uma diferença significativa entre os tratamentos, com redução de cerca de 90% na imunomarcção de TH na SNc dorsal ($F_{5,35} = 320.21$, $p < .0001$, **Figura23C**) e 80% nas fibras TH⁺ estriatais dorsais e ventrais (respectivamente, $F_{5,35} = 571.35$ E 136.00 , $p < .0001$, **Figura23D**). Nessa conjuntura, houve um efeito positivo da administração i.n. do CDNF, particularmente a dose de 100 µg, aumentando significativamente a expressão de corpos neuronais TH⁺ da SNc ($p < .0001$ vs. 6-OHDA + veículo) (**Figura23C**). Além de um efeito dessa mesma dose (CDNF 100 µg) no estriado dorsal ($p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo), neste caso, reduzindo a densidade de fibras estriatais (M = 19,6 – 11,4%) (**Figura23D**). A neurorestauração parcial, de cerca de 50%, ocasionada pela administração i.n. do CDNF 100 µg pode ser observada na **Figura23B**, onde imagens representativas de secções mediais da SNc tornam visível tal efeito.

Figura 23: Efeito da administração intranasal do CDNF sobre o imunoc conteúdo de TH em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



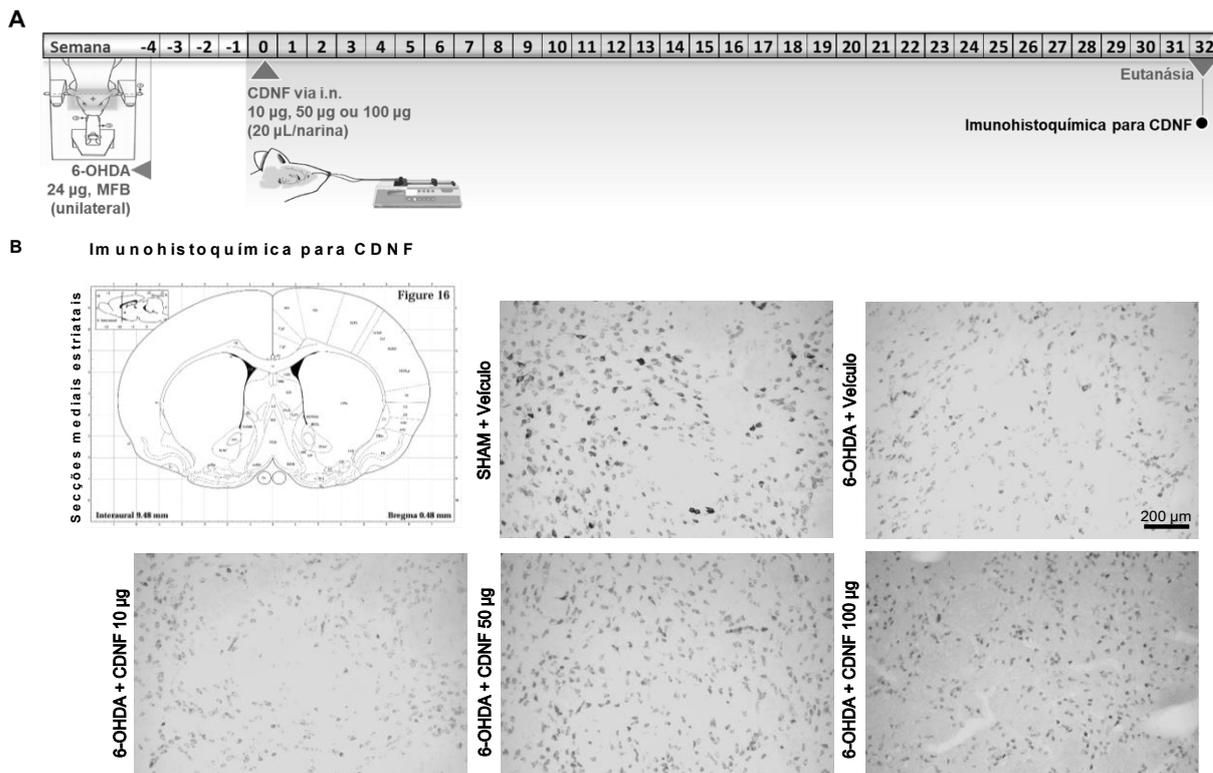
Legenda: (A) Desenho experimental indicando a semana de eutanásia dos animais e posterior imunohistoquímica para a TH. (B – D) Para avaliação de um possível efeito neurorestaurador da administração i.n. do CDNF sob a lesão induzida pela 6-OHDA, na 32ª pós-administração i.n., foi analisada a imunorreatividade da TH, utilizada como marcador para neurodegeneração dopaminérgica. (B e C) Foram avaliadas a região dorsal da SNC, imagens representativas e semiquantificação, respectivamente e (D) as regiões dorsal e ventral do estriado. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 5-9/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo (na mesma região, quando for o caso). ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Tukey HSD. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal; TH: tirosina hidroxilase (A).

6.1.5 Efeitos da administração i.n. do CDNFrh sobre os níveis do CDNFh/CDNFr

6.1.5.1 Administração i.n. do CDNF (10, 50 e 100 µg) e os níveis de CDNF endógeno através da técnica de imunohistoquímica no estriado e na SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

Após a caracterização da lesão dopaminérgica na via nigroestriatal e efeito neurorestaurador da administração i.n. do CDNF (no caso, a proteína recombinante humana – CDNFrh), pretendeu-se também avaliar o efeito da lesão com a 6-OHDA no MFB sobre os níveis de CDNF bem como o efeito do tratamento a posteriori com o CDNF i.n. sobre sua própria expressão. Para isso, após as 32 semanas da administração i.n. (como demonstrado na **Figura24A**), realizou-se a imunohistoquímica com anticorpo anti-CDNF reativo tanto para a isoforma humana (administrada via i.n.) quanto para a de roedor (PRS4343 – Sigma-Aldrich, MO, EUA). Na **Figura24B** podem ser vistas imagens representativas da imunohistoquímica em secções mediais estriatais, as quais demonstram uma possível redução da imunorreatividade do CDNF no grupo 6-OHDA + veículo com possível reversão diante da administração i.n. do CDNFrh em suas maiores doses (50 e 100 µg). Contudo, diante de um número de animais reduzido no experimento (n = 2/grupo), não se avaliou estatisticamente tais evidências. A SN não demonstrou quaisquer modificações aparentes na imunomarcacão de CDNF (igualmente com n = 2/grupo, dados não mostrados).

Figura 24: Efeito da administração intranasal do CDNFrh sobre o imunocontéudo do CDNFh/CDNFr em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental indicando a semana de eutanásia dos animais e posterior imunohistoquímica para o CDNFh/CDNFr. (B) Imagens representativas da imunomarcção de CDNF estriatal realizada 32 semanas após a administração i.n. (n = 2/grupo). MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

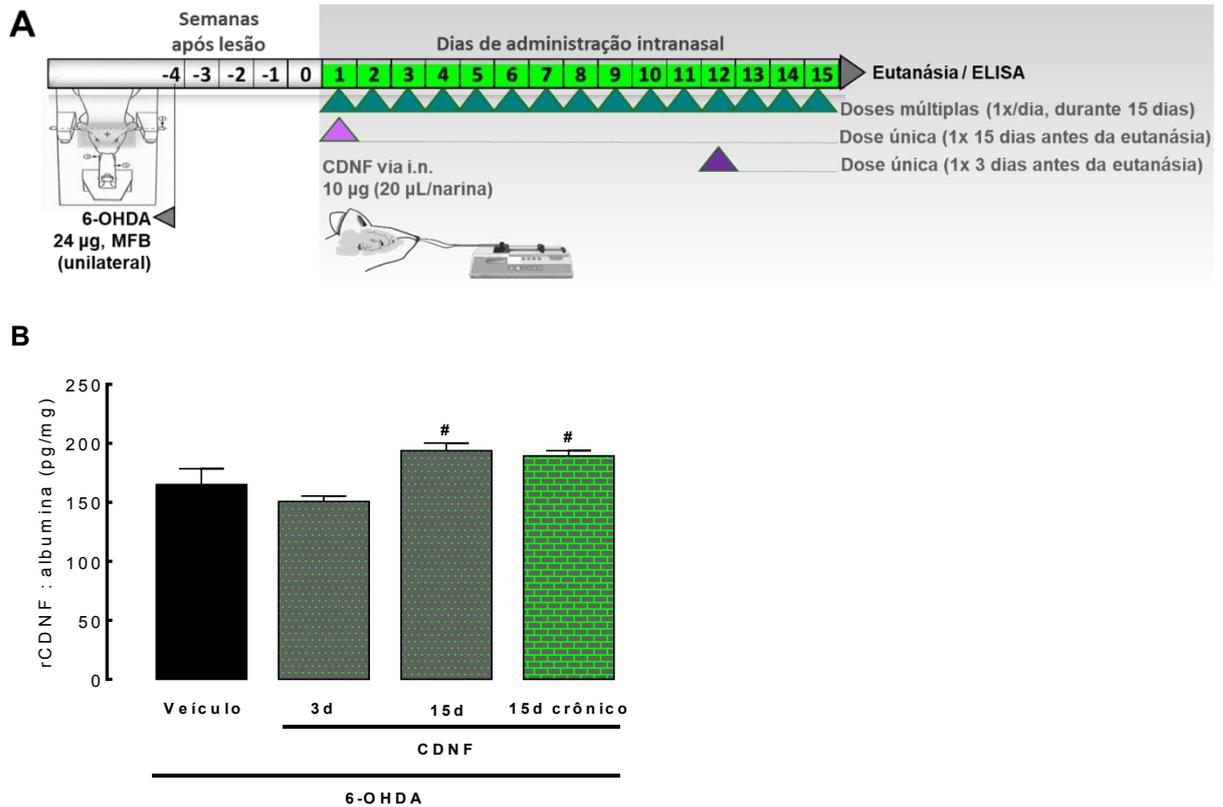
6.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL CRÔNICA DO CDNF

6.2.1 Comparação da administração i.n. em dose única do CDNF vs. doses múltiplas

6.2.1.1 Administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNFrh (10 µg) e os níveis endógenos de CDNF (CDNFr) através do ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) no estriado e SN de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

Demonstrado o potencial restaurador da administração i.n. do CDNF em um modelo da DP com extensa neurodegeneração dopaminérgica e prejuízos funcionais motores e não motores, utilizou-se a menor dose efetiva do CDNF i.n. (10 µg) para comparar os efeitos a curto prazo de uma única dose ao de multidoses do NTF administrado por via i.n. (**Figura25** e **Figura26**). Primeiramente, como pode ser visto na **Figura25A**, dois grupos experimentais receberam uma única administração i.n. do CDNF (10 µg, 15 ou 3 dias antes da eutanásia), enquanto outro grupo foi tratado cronicamente com o CDNF i.n. (10 µg/dia, durante 15 dias) e após eutanásia foram quantificados os níveis do CDNF no estriado através da técnica de ELISA. A análise a partir da ANOVA de uma via indicou diferença nos níveis estriatais do CDNF entre os grupos experimentais ($F_{3,16} = 6.41, p < .005$), de forma que o teste *post-hoc* de Newman Keuls revelou que após 15 dias de tratamento com o CDNF i.n., seja com uma única dose ou doses múltiplas, ambas aumentam significativamente os níveis do CDNF no estriado dos animais ($p < .05$ vs. 6-OHDA + veículo), em igual proporção (6-OHDA + veículo, M = 165 vs. 194 e 189 pg/mg, respectivamente) (**Figura25B**). Enfatiza-se que o kit de ELISA utilizado tem sensibilidade para detecção do CDNF de *Rattus norvegicus* – CDNFr (SEG458Ra – Cloud-Clone, TX, EUA), de forma que o CDNF recombinante humano (CDNFrh) administrado por via i.n. não apresenta reatividade com tal.

Figura 25: Efeito da administração intranasal em dose única e doses múltiplas do CDNFrh sobre os níveis do CDNFr em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.

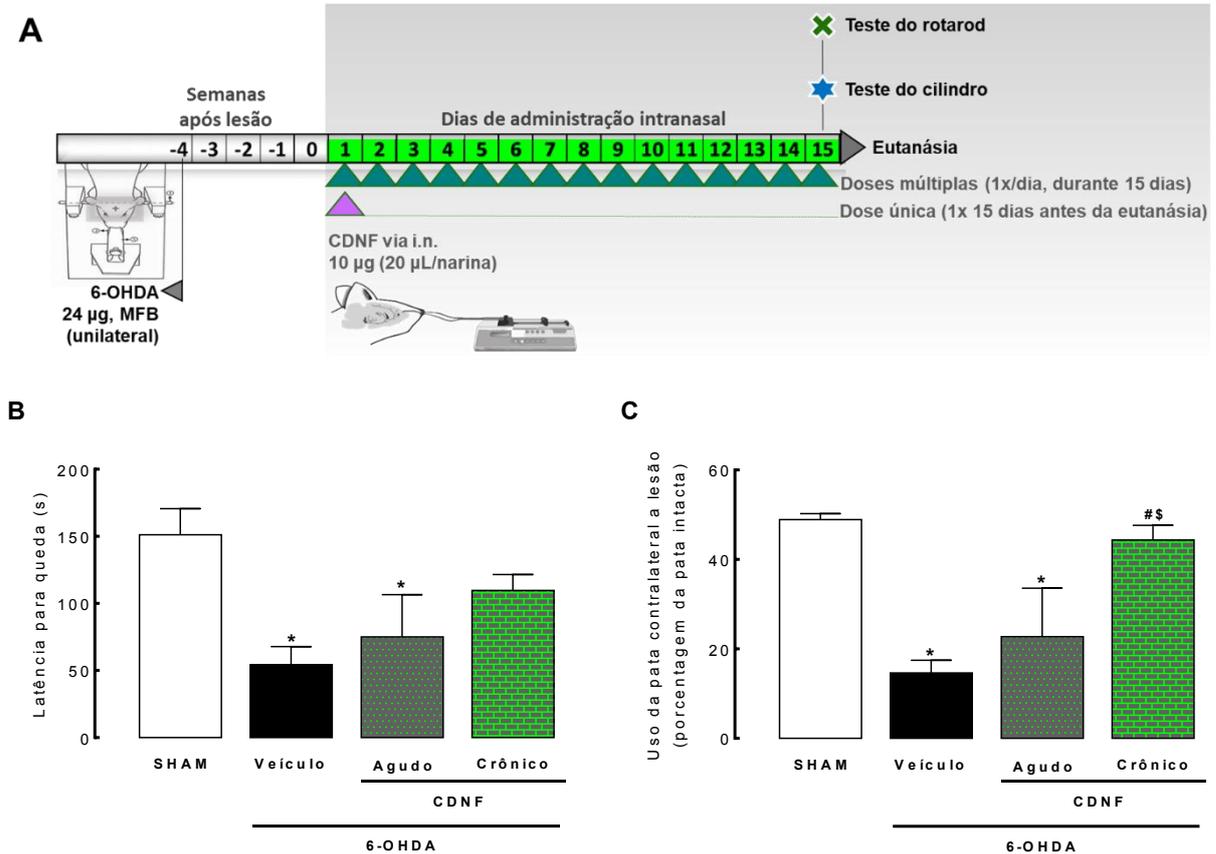


Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de administração i.n. do CDNFrh em dose única ou doses múltiplas e posterior ELISA para o CDNFr. (B) Quantificação dos níveis estriatais do CDNFr/albumina em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB e tratados com uma única dose do CDNF i.n. (10 µg, 3 ou 15 dias anterior a eutanásia) ou cronicamente (10 µg/dia, durante 15 dias). Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n= 5/grupo); # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA+ veículo. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.2.1.2 Administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNF_{rh} (10 µg) e parâmetros da função motora, avaliados no teste do rotarod e teste do cilindro em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Além da quantificação estriatal dos níveis de CDNF_r por ELISA, foi comparado o efeito do tratamento agudo com o CDNF i.n. (10 µg, 15 ou 3 dias antes da eutanásia) ao tratamento crônico (CDNF 10 µg/dia, durante 15 dias) em parâmetros da função motora de animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Para essa avaliação foi realizado o teste do rotarod (verificando especialmente equilíbrio e coordenação dos animais) e o teste do cilindro (verificando-se a assimetria e viés de lateralidade), ambos no 15º dia após o início do tratamento com CDNF i.n. (**Figura26A**). A ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls evidenciou uma diferença na latência para a queda do rotarod dos lesionados com a 6-OHDA e tratados com veículo ou com o tratamento agudo com o CDNF i.n. ($F_{3,13} = 4.65, p < .05$ vs. SHAM), diferentemente do tratamento crônico com o CDNF i.n., que apresentou média de latência para a queda semelhante aos animais controle nessa tarefa ($p > .05$ vs. SHAM) (**Figura26B**). Este mesmo perfil do efeito do tratamento agudo vs. crônico com CDNF i.n. foi observado no teste do cilindro, onde o prejuízo causado pela 6-OHDA ($F_{3,13} = 9.14, p < .005$ vs. SHAM) somente foi revertido, em curto prazo, pelo tratamento crônico com o CDNF i.n. ($p > .05$ vs. SHAM) (**Figura26C**).

Figura 26: Efeito da administração intranasal em dose única e doses múltiplas do CDNFrh sobre parâmetros de coordenação, equilíbrio e assimetria motora em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.

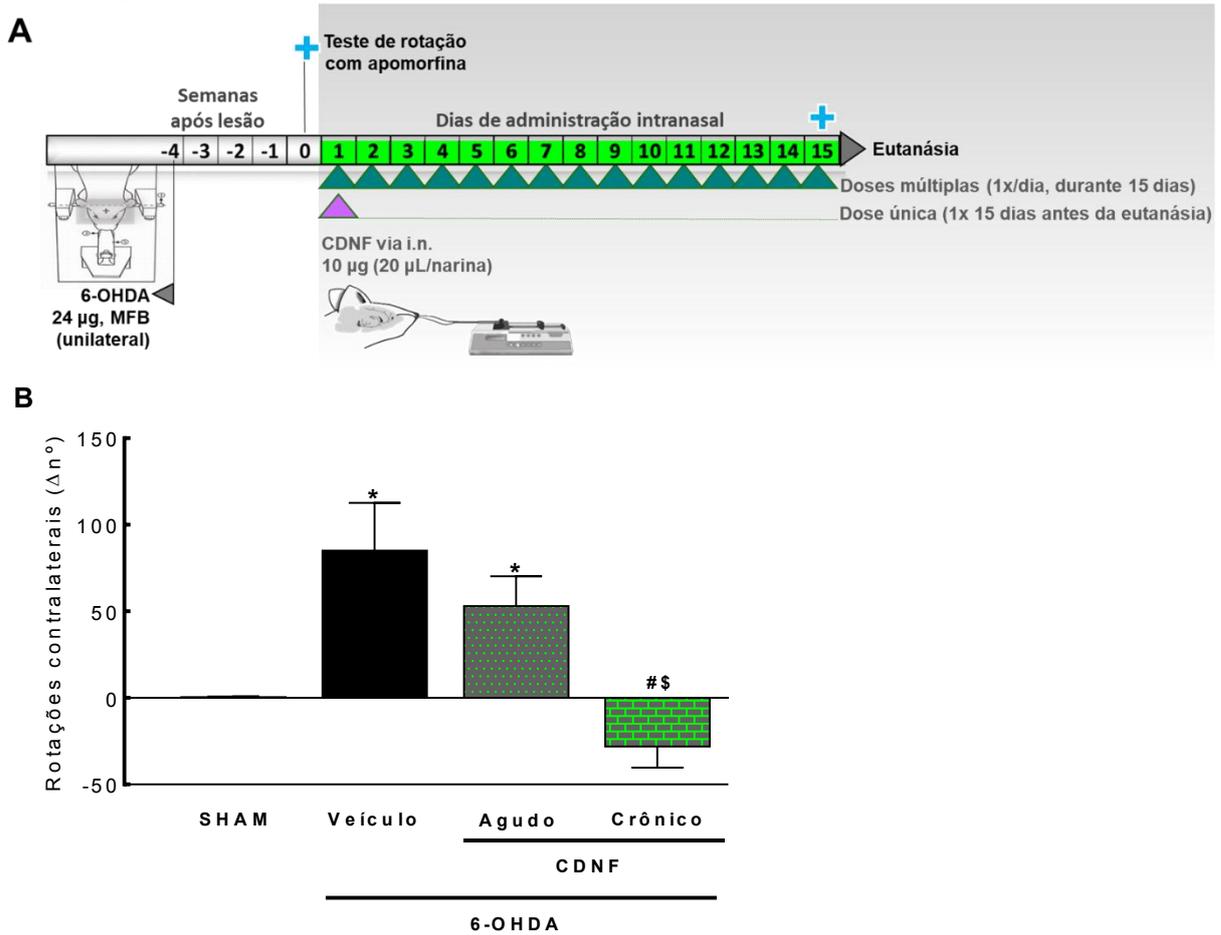


Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de administração i.n. do CDNFrh em dose única ou doses múltiplas indicando o dia de realização do teste do rotarod e teste do cilindro. (B) O teste do rotarod para avaliação da coordenação e equilíbrio motor, assim como (C) o teste do cilindro para avaliação da assimetria dos membros dianteiros, foram realizados no 15º dia após uma única dose do CDNF i.n. (10 µg, 3 ou 15 dias anterior a eutanásia) ou do tratamento crônico com o CDNF i.n. (10 µg/dia, durante 15 dias) em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n= 4-5/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo; \$ $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + CDNF agudo. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

6.2.1.3 Administração i.n. em dose única e doses múltiplas do CDNF_{rh} (10 µg) e o nível de lesão dopaminérgica avaliada indiretamente pelo teste de rotação induzido pela apomorfina em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Por fim, ainda foi comparado o efeito do tratamento agudo com o CDNF i.n. (10 µg, 15 ou 3 dias antes da eutanásia) ao tratamento crônico (CDNF 10 µg/dia, durante 15 dias) sobre o nível de lesão dopaminérgica em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Para essa avaliação foi realizado o teste de rotação com apomorfina, teste comportamental indicativo do nível de lesão, anterior ao protocolo de administração i.n. e no 15º dia após o início do tratamento com CDNF i.n. (**Figura27A**). A ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls evidenciou uma diferença no delta de rotações contralaterais à lesão da avaliação pós-CDNF i.n. para a avaliação pré-CDNF i.n., como indicado pela ANOVA de uma via ($F_{3,12} = 8.55, p < .005$). O teste *post-hoc* de Newman Keuls indicou uma diferença no grupo tratado cronicamente com o CDNF i.n. ($p < .05$ vs. SHAM, 6-OHDA + veículo e CDNF agudo), essa redução no número de rotações contralaterais à lesão diante da administração i.n. crônica do CDNF foi expressiva, como pode ser observado na **Figura27B**.

Figura 27: Efeito da administração intranasal em dose única e doses múltiplas do CDNFrh sobre o nível de lesão dopaminérgica em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de administração i.n. do CDNFrh em dose única ou doses múltiplas indicando os dias de realização do teste de rotação induzido pela apomorfina. (B) O teste de rotação induzido pela administração de apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.) para avaliação comportamental do nível de lesão dopaminérgica. O teste foi realizado anteriormente ao início do protocolo de administração i.n. (semana 0) e no 15º dia após uma única dose do CDNF i.n. (10 µg, 3 ou 15 dias anterior a eutanásia) ou do tratamento crônico com o CDNF i.n. (10 µg/dia, durante 15 dias) em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Para representação dos resultados foi realizado o delta de variação do número de rotações contralaterais à lesão da segunda avaliação em relação à primeira (Δn°). Os dados são expressos como média \pm e.p.m. (n= 4-5/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo; \$ $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + CDNF agudo. ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls. Os símbolos representam a semana e frequência de repetição do respectivo teste ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; s.c.: subcutânea; i.n.: intranasal (A).

6.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO TRATAMENTO CRÔNICO COM A L-DOPA ASSOCIADA AO CDNF INTRANASAL

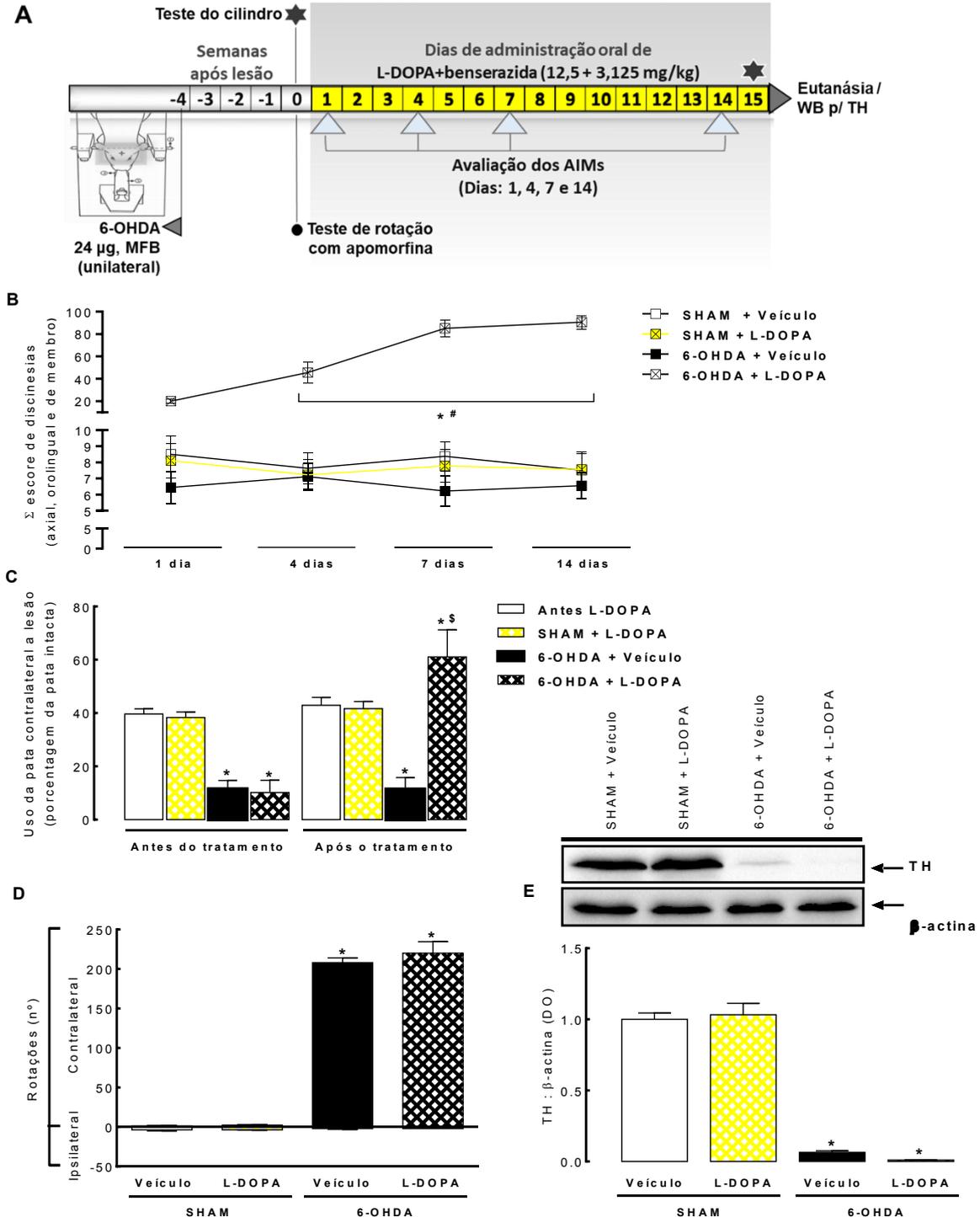
6.3.1 Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA sobre os níveis de NTFs

6.3.1.1 Tratamento crônico com a L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida), parâmetros da função motora e caracterização da indução de discinesias em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

Visto o efeito da administração i.n. crônica do CDNF, a próxima etapa do presente estudo tratou de avaliar o resultado da associação da L-DOPA ao CDNF i.n., sobre parâmetros motores e das LIDs em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Para isso, inicialmente, caracterizou-se a presença das discinesias induzidas pela L-DOPA (**Figura28**) e o impacto do tratamento crônico com a L-DOPA sobre os níveis do CDNF e do GDNF (**Figura29**). Após a indução da lesão com a 6-OHDA e avaliação motora com o teste do cilindro e teste de rotação com apomorfina, os animais foram tratados por 15 dias com a L-DOPA (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida, v.o.) e avaliou-se a presença e magnitude das LIDs nos dias 1, 4, 7 e 14 de tratamento, sendo que ao final, realizou-se novamente o teste do cilindro com o objetivo de certificar-se do efeito antiparkinsoniano da L-DOPA. Após a eutanásia, o estriado dos animais foi coletado para posterior quantificação dos níveis de TH (**Figura28A**) e dos NTFs (**Figura29A**) através da técnica de Western Blotting.

A indução das LIDs foi confirmada a partir da ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls que indicou significância para a interação dos fatores: lesão, tratamento e tempo/repetições ($F_{3,90} = 55.3, p < .0001$), nos animais lesionados com a 6-OHDA e tratados com a L-DOPA ($p \leq .0001$ vs. SHAM + veículo) a partir do 4º dia de avaliação dos AIMS e tratamento (**Figura28B**). Assim também, caracterizou-se a presença de prejuízo motor em animais lesionados com a 6-OHDA, no teste do cilindro, e a reversão do dano após 15 dias de tratamento com a L-DOPA ($F_{1,28} = 19.9, p < .05$ vs. SHAM + veículo e 6-OHDA + veículo após o tratamento) (**Figura28C**). Bem como a presença da lesão dopaminérgica diante da administração da 6-OHDA no MFB, através do teste de rotação com apomorfina (**Figura28D**) e quantificação da TH estriatal por Western Blotting (**Figura28E**), ambas a partir da ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* de Newman Keuls ($F_{1,28} = 313.4$ e $448.1, p \leq .0005$ vs. SHAM + veículo, respectivamente o nº de rotações contralaterais à lesão e níveis de TH).

Figura 28: Efeito da administração crônica de L-DOPA sobre a indução de discinesias, prejuízo motor e imunocnteuído de TH em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.

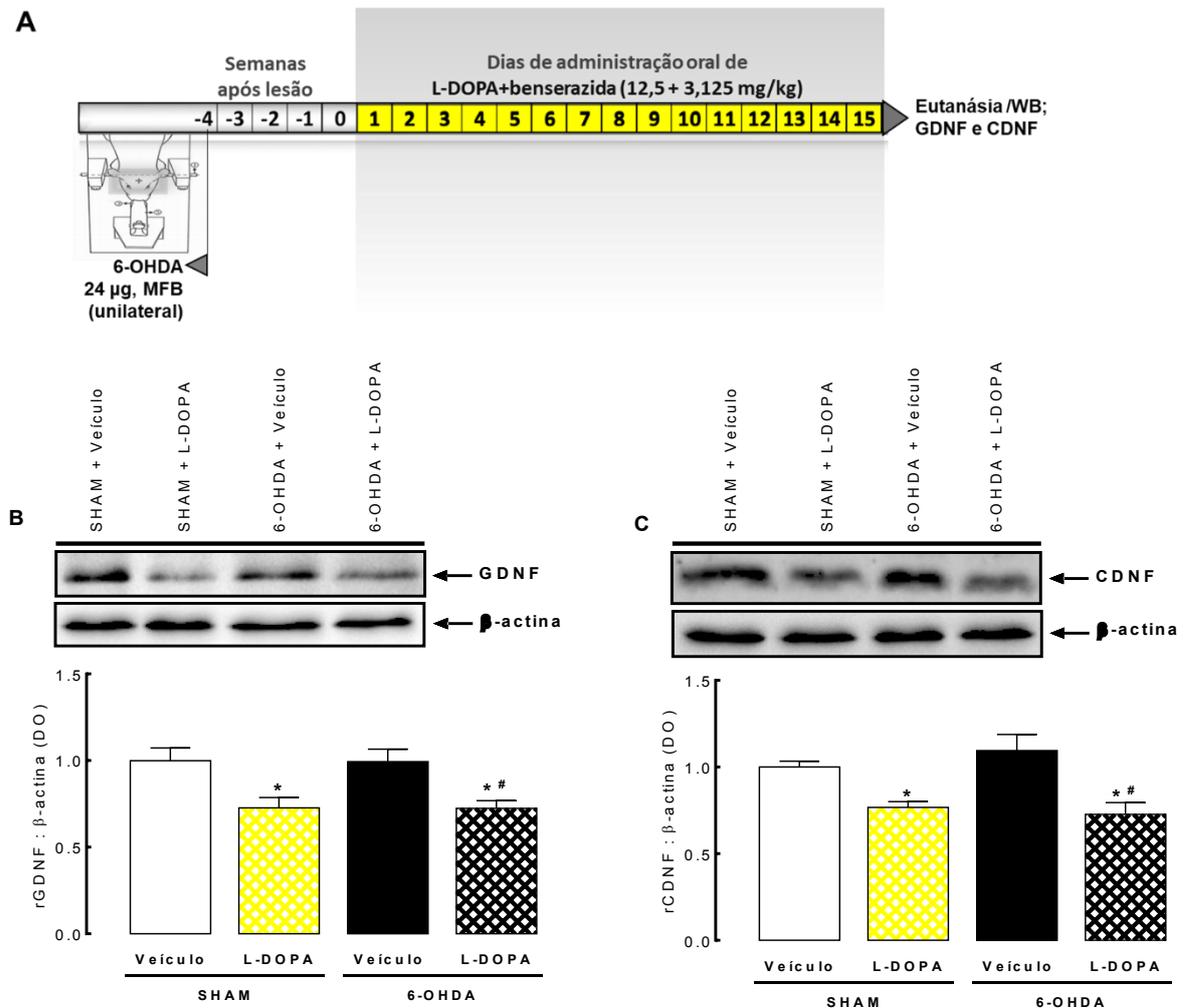


Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de tratamento crônico com a L-DOPA, indicando o dia de (B) avaliação dos AIMs, (C) teste do cilindro, (D) teste da rotação com apomorfina e eutanásia com posterior (E) quantificação dos níveis estriatais de TH por WB. Para caracterização das LIDs e do efeito antiparkinsoniano foi realizada a administração de L-DOPA via oral (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) por 15 dias, 1 vez ao dia em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 8-9/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo e \$ $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo (antes da L-DOPA). ANOVA de medidas repetidas e ANOVA de duas vias, ambas seguidas do teste *post-hoc* de Newman Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; WB: *Western Blotting*; AIMs: movimentos involuntários anormais; TH: tirosina hidroxilase (A).

4.3.1.2 Tratamento crônico com a L-DOPA v.o. e o imunoconteúdo de NTFs (GDNF e CDNF) analisado através da técnica de Western Blotting no estriado de ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

O impacto do tratamento crônico com a L-DOPA sobre os níveis do CDNF e do GDNF no estriado de animais lesionados com a 6-OHDA no MFB foi avaliado ao final do protocolo de indução das LIDs (**Figura29A**). Para ambos, CDNF (**Figura29B**) e GDNF (**Figura29C**), foi observado um perfil de redução em seus níveis estriatais diante do tratamento com a L-DOPA, cerca de 25% diminuição ante a administração de L-DOPA *per se* durante 15 dias. Como indicado pela ANOVA de duas vias e teste *post-hoc* de Newman Keuls, independente da lesão com a 6-OHDA ou a presença de discinesias, o tratamento crônico com a L-DOPA levou à redução estriatal do imunoconteúdo do CDNF ($F_{1,20} = 20.9, p < .05$ vs. SHAM + veículo e 6-OHDA + veículo) e do GDNF ($F_{1,25} = 19.2, p < .05$ vs. SHAM + veículo e 6-OHDA + veículo).

Figura 29: Efeito da administração crônica de L-DOPA sobre o imunocnteuído de NTFs em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de tratamento crônico com a L-DOPA e quantificação dos níveis de NTFs por Western Blotting. Para avaliação do efeito da L-DOPA sobre os níveis de NTFs foi realizada a administração crônica de L-DOPA via oral (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) por 15 dias, 1 vez ao dia em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Os níveis de (B) CDNF e (C) GDNF foram quantificados no estriado dos animais. Os dados são expressos como média ± e.p.m. (n = 5-8/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. SHAM + veículo; # $p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo. ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; WB: *Western Blotting* (A).

4.3.1.3 Análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis estriatais de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) em ratos tratados com a L-DOPA (discinéticos e não discinéticos) e lesionados com a 6-OHDA no MFB

Com o intuito de reforçar os achados de modulação dos níveis proteicos de CDFN e GDNF frente o tratamento crônico com a L-DOPA, a expressão gênica de alguns NTFs foi verificada a partir da análise do perfil de expressão diferencial, utilizando dados de sequenciamento de RNAm. Os dados para análise de expressão diferencial foram obtidos a partir de um conjunto de dados do *Gene Expression Omnibus* (GSE88726), o qual disponibiliza dados de sequenciamento do estriado e da SN de ratos machos Sprague-Dawley, lesionados unilateralmente com a 6-OHDA e tratados, após 3,5 semanas, com L-DOPA durante 14 dias.

Os genes de interesse para o atual estudo foram aqueles em que as proteínas codificadas possuem atividades tróficas sobre neurônios dopaminérgicos: CDFN, GDNF, BDNF e NGF. Para estes NTFs verificou-se a variância perante o tratamento com a L-DOPA, em animais discinéticos e não discinéticos, vs. animais controles (6-OHDA + veículo) e calculou-se os tamanhos de efeito tanto no estriado (**Tabela1** e **Figura30A**), quanto na SN (**Tabela2** e **Figura30B**). Como resultado, foi observado que justamente a expressão gênica do CDFN possui uma tendência ($p = .08$ vs. 6-OHDA + veículo) em ser modulada diante do tratamento com a L-DOPA no estriado de animais discinéticos (**Tabela1**). Como melhor visualizado na **Figura30A**, os níveis de RNAm do CDFN em animais tratados cronicamente com a L-DOPA e que desenvolveram as LIDs, apresentam-se cerca de 14% mais elevados do que em animais controles. Os demais NTFs avaliados não apresentaram quaisquer diferenças significativas de expressão diferencial diante do tratamento crônico com a L-DOPA.

Tabela 1: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF no estriado de animais lesionados com a 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA.

NTF	Grupo experimental	Diferença	valor de <i>p</i>
CDNF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	1,14	.0707 **
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	1,06	.3939
GDNF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	-1,08	.5525
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	-1,02	.8119
BDNF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	1,09	.5881
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	1,03	.9150
NGF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	-1,04	.8480
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	1,01	.6307

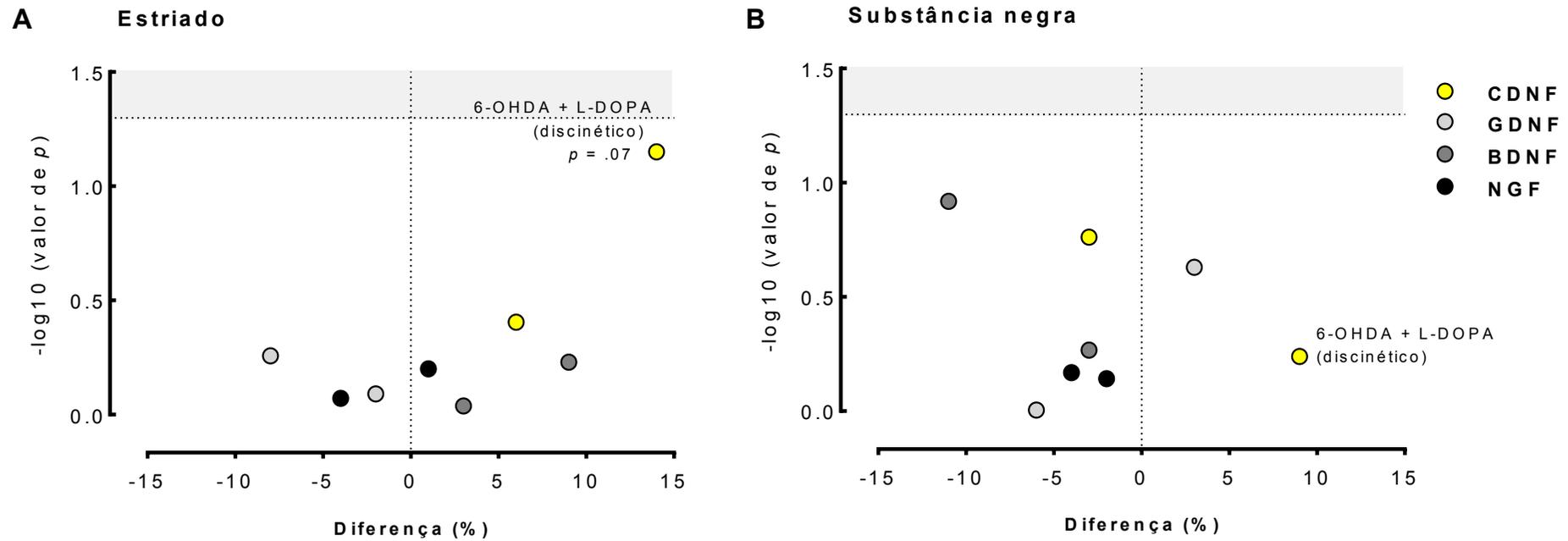
Legenda: Níveis dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF de animais lesionados com a 6-OHDA e, após 3,5 semanas, tratados com a L-DOPA durante 14 dias, discinéticos e não discinéticos (n = 3/grupo). **p* = .07 vs. 6-OHDA + veículo.

Tabela 2: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF na substância negra de animais lesionados com a 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA.

NTF	Grupo experimental	Diferença	valor de <i>p</i>
CDNF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	-1,09	.5754
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	-1,03	.1729
GDNF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	1,03	.2347
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	-1,06	.9873
BDNF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	-1,03	.5405
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	-1,11	.1205
NGF	6-OHDA + L-DOPA (discinético)	-1,04	.6780
	6-OHDA + L-DOPA (não discinético)	-1,02	.7206

Legenda: Níveis dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF de animais lesionados com a 6-OHDA e, após 3,5 semanas, tratados com a L-DOPA durante 14 dias, discinéticos e não discinéticos (n = 3/grupo). *p* < .05 vs. 6-OHDA + veículo.

Figura 30: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em animais lesionados com a 6-OHDA e tratados cronicamente com a L-DOPA.



Legenda: Níveis de expressão dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF no (A) estriado e (B) SN de animais lesionados com a 6-OHDA e, após 3,5 semanas, tratados com a L-DOPA durante 14 dias, discinéticos e não discinéticos (n = 3/grupo). A parte hachurada do gráfico representa o limiar de significância ($p \leq .05$ ou $-\log_{10} \approx 1.3$); teste t de *Student vs.* 6-OHDA + veículo.

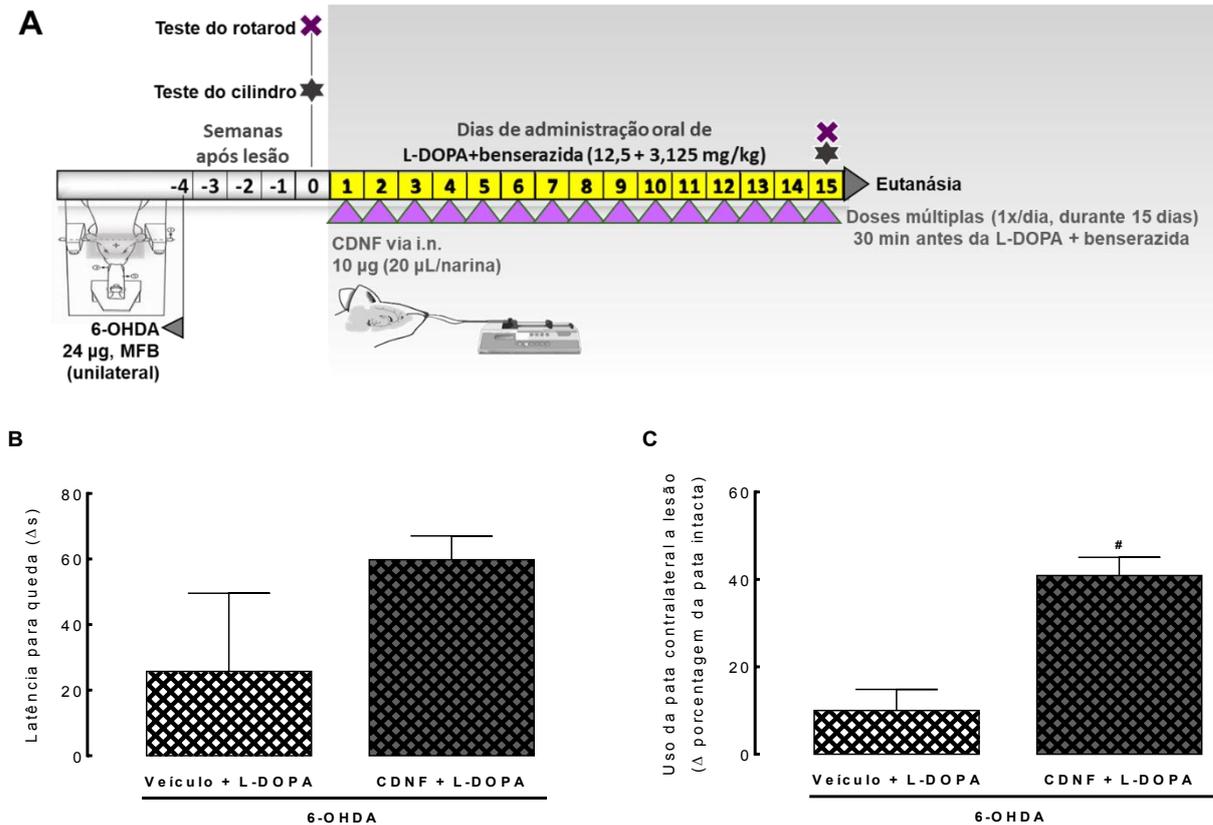
6.3.2 Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n.

6.3.2.1 Administração crônica do CDNF i.n. (10 µg) e da L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) e parâmetros da função motora, avaliados no teste do rotarod, teste do cilindro e teste de rotação com apomorfina em ratos lesionados com a 6-OHDA no MFB

Dada a modulação exercida pelo tratamento crônico com a L-DOPA sobre os níveis estriatais de NTFs, pretendeu-se então verificar o efeito da associação da L-DOPA ao CDNF i.n. sobre parâmetros motores e das LIDs em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Em relação a função motora foram realizados o teste do rotarod, teste do cilindro e teste de rotação induzido pela apomorfina antes e após o tratamento conjunto da L-DOPA com o CDNF i.n. (**Figura 31**), ao passo que se avaliou neste intervalo também a expressão dos AIMS e ao final do protocolo quantificou-se os níveis estriatais de CDNF pela técnica de ELISA (**Figura 32**).

O protocolo de tratamento crônico com a L-DOPA seguiu conforme o que recém caracterizado e a administração i.n. do CDNF 10 µg ocorreu 30 min antes da L-DOPA, como indicado na **Figura 31A**. Considerando-se as diferenças basais evidenciadas pelo teste t de *Student* para amostras independentes no desempenho motor entre os grupos [latência para a queda no teste do rotarod: M = 127 e 62s ($p < .05$) e porcentagem de uso da pata lesionada no teste do cilindro: M = 35 e 10% ($p < .05$), respectivamente para 6-OHDA + veículo + L-DOPA e 6-OHDA + CDNF i.n. + L-DOPA) – dados não mostrados], a análise estatística do efeito antiparkinsoniano sobre a coordenação, equilíbrio e assimetria motora foi realizada a partir do delta de variação do desempenho de ambos os grupos antes e após o tratamento. Assim, avaliando-se o delta de incremento no desempenho motor, viu-se que no teste do rotarod não houveram diferenças estatísticas entre os tratamentos ($t_{10} = -1.17$, $p = .27$) (**Figura 31B**). Todavia, no teste do cilindro os animais tratados com o CDNF i.n. juntamente à L-DOPA apresentaram uma melhora mais robusta do que aqueles que não receberam o NTF por via i.n. ($t_{10} = -4.56$, $p < .001$ vs. 6-OHDA + veículo + L-DOPA), após 15 dias de tratamento. Enquanto o grupo dos animais lesionados e tratados com veículo + L-DOPA apresentaram um ganho de função de aproximadamente 10% no teste do cilindro, os tratados com a associação (CDNF i.n. + L-DOPA) tiveram um incremento próximo a 60% no uso da pata contralateral à lesão em relação ao desempenho antes do tratamento (**Figura 31C**). Em relação ao teste de rotação induzido pela apomorfina, não houveram diferenças entre os grupos experimentais ($t_4 = -0.51$, $p = .63$; Δn° de rotações contralaterais à lesão M = 85 e 119).

Figura 31: Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n. sobre o equilíbrio, coordenação e assimetria motora de animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n., indicando os dias de realização do teste do rotarod e teste do cilindro. (B) O teste do rotarod e (C) o teste do cilindro foram realizados antes do início do tratamento e ao final, 15 dias após. A administração i.n. do CDNF 10 µg antecedeu em 30 min o tratamento com a L-DOPA por via oral (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida) durante 15 dias, 1 vez ao dia em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Os resultados estão representados como um delta da variação do desempenho final pelo inicial e expressos como média \pm e.p.m. ($n = 5-7$ /grupo); $\#p \leq 0,05$ vs. 6-OHDA + veículo + L-DOPA. Teste t de *Student* para amostras independentes. Os símbolos representam a semana e frequência de repetição do respectivo teste ao qual estão alinhados. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal (A).

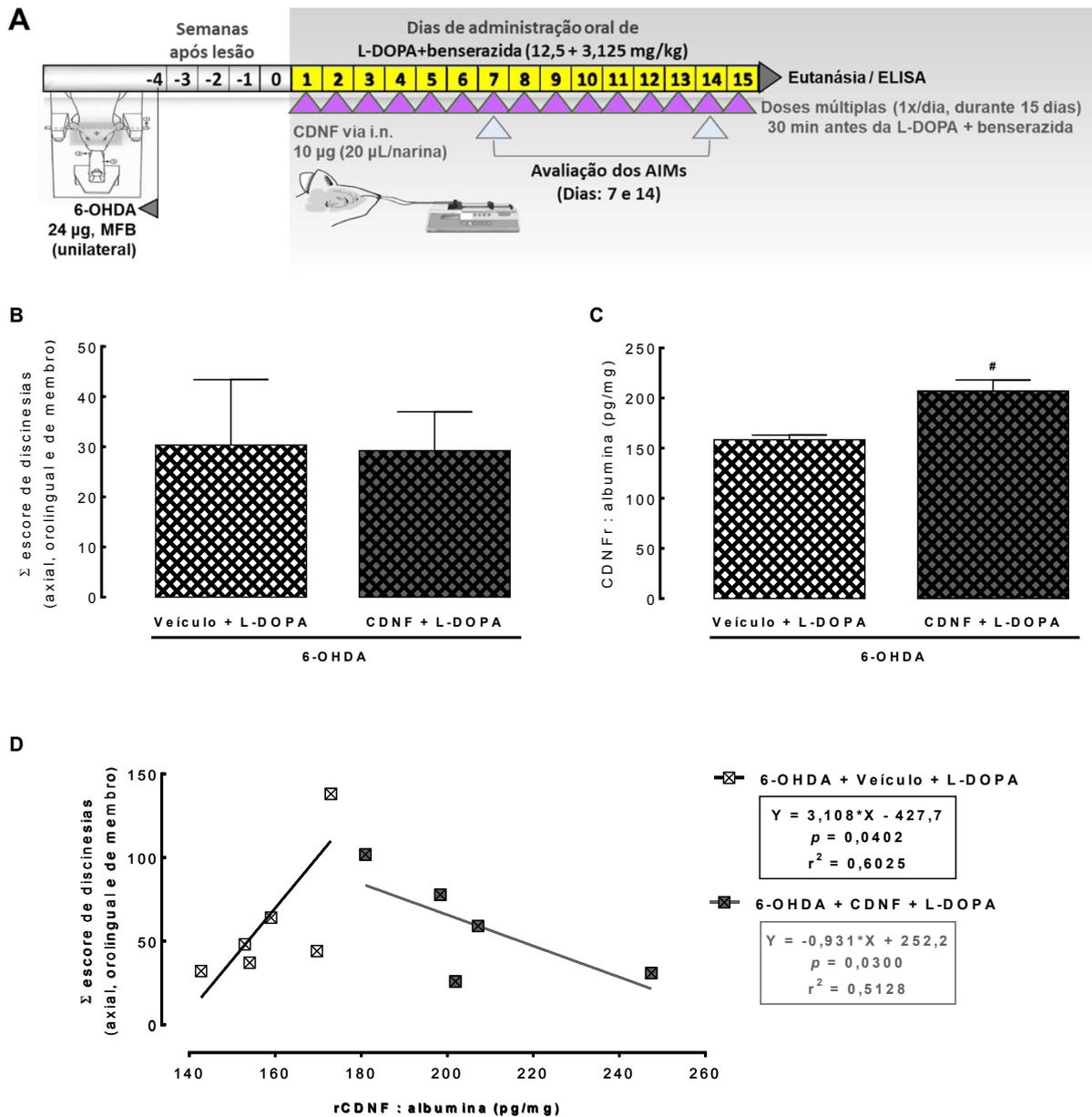
6.3.2.2 Administração i.n. crônica do CDNF (10 µg) e as LIDs em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

De fato, avaliar o potencial do tratamento crônico da L-DOPA associada ao CDNF i.n. esteve relacionado principalmente a sua possível aplicação terapêutica sobre as discinesias. Verificou-se as LIDs através dos escores de AIMS nos animais nos dias 7 e 14 após o início do tratamento com a L-DOPA ou associação, como demonstrado na **Figura 32A**. Entretanto, nenhuma diferença estatística foi encontrada nos escores de AIMS frente à associação da L-DOPA + CDNF i.n. (**Figura 32B**). Como indicado pela ANOVA de medidas repetidas e pelos dados do fator interação: tratamento e tempo/repetição ($F_{1,8} = .08$, $p = ns$), é inexistente quaisquer diferenças entre os grupos experimentais, tanto no aparecimento quanto no desenvolvimento das LIDs.

6.3.2.2.1 Correlação entre os níveis estriatais de CDNF_r analisados por ELISA e a gravidade das LIDs em ratos lesionados com 6-OHDA no MFB

Passada a avaliação de parâmetros da função motora e das LIDs no protocolo de administração crônica da L-DOPA associada ao CDNF i.n., foram quantificados os níveis estriatais do CDNF_r através da técnica de ELISA e estes foram correlacionados aos escores de AIMS. Primeiramente, a análise a partir do teste t de *Student* para amostras independentes revelou que a associação da L-DOPA ao CDNF i.n. foi capaz de aumentar o imunocontéudo de CDNF_r no estriado dos animais após o tratamento durante 15 dias ($t_9 = -4.36$, $p \leq .001$ vs. veículo + L-DOPA) (**Figura 32C**). Assim, apesar da inexistência de diferenças nos escores de AIMS, relacionou-se os dados das LIDs aos níveis estriatais de CDNF_r de cada um dos animais através de uma correlação linear de Pearson. A análise de Pearson demonstrou que no grupo não tratado com o CDNF i.n. (veículo + L-DOPA) há uma correlação positiva, ou seja, quanto maior os níveis estriatais de CDNF_r maior os índices de LIDs ($r^2 = .60$, $p = < .05$) (**Figura 32D**). Já no grupo tratado com o CDNF i.n., evidenciou-se justamente o inverso, quanto maior os níveis de CDNF_r estriatal, menor foram os escores de AIMS, demonstrando uma relação negativa moderada dos níveis de CDNF com as LIDs ($r^2 = .51$, $p = < .05$).

Figura 32: Efeito do tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n. sobre as LIDs e os níveis estriatais de CDNFr em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB.



Legenda: (A) Desenho experimental do protocolo de tratamento crônico com a L-DOPA associado ao CDNF i.n., indicando os dias de avaliação dos AIMs e eutanásia com posterior quantificação do CDNFr. (B) A quantificação dos escores de AIMs foi realizada nos dias 7 e 14 após o início do tratamento com a L-DOPA. (C) Os níveis de CDNFr estriatais foram quantificados a partir da técnica de ELISA após 15 dias de tratamento e eutanásia dos animais. (D) Os níveis de CDNFr foram correlacionados aos escores de AIMs nos animais lesionados com a 6-OHDA e tratados com veículo + L-DOPA (equação da reta à esquerda do gráfico) e em animais lesionados e tratados com CDNF i.n. + L-DOPA (equação da reta à direita do gráfico). Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. (n = 5-7/grupo); #p \leq 0,05 vs. 6-OHDA + veículo + L-DOPA. Teste t de *Student* para amostras independentes. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; i.n.: intranasal; AIMs: movimentos involuntários anormais (A).

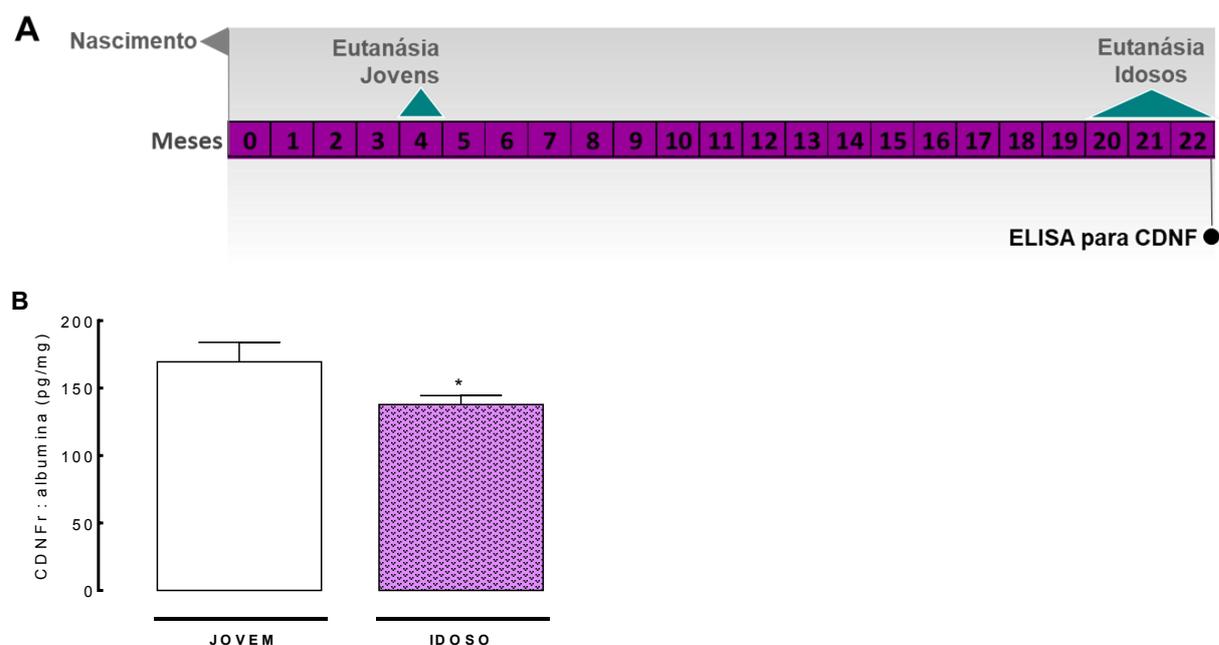
6.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATORES NEUROTROFICOS NO ENVELHECIMENTO E NA DOENÇA DE PARKINSON

6.4.1 Efeito do envelhecimento sobre os níveis de NTFs

6.4.1.1 Níveis do CDNF no estriado de animais jovens e idosos quantificados através da técnica de ELISA

Além de avaliar os efeitos da administração i.n. do CDNF em um modelo da DP avançada, objetivou-se verificar a influência que fatores envolvidos com a DP teriam *per ser* sobre os níveis de diferentes NTFs, como no caso o envelhecimento. Assim, como resultado inicial dessa etapa do trabalho, realizou-se a quantificação dos níveis estriatais de CDNF em animais idosos (20-22 meses de idade) e jovens (4 meses) através da técnica de ELISA, logo após eutanásia (**Figura 33A**). A análise estatística a partir do teste t de *Student* unicaudal para amostras independentes, corroborou com a hipótese de que animais idosos apresentariam menor conteúdo estriatal de CDNF ($t_{10} = 2.00, p \leq .05$ vs. jovem) (**Figura 33B**).

Figura 33: Efeito do envelhecimento sobre os níveis do CDNF.

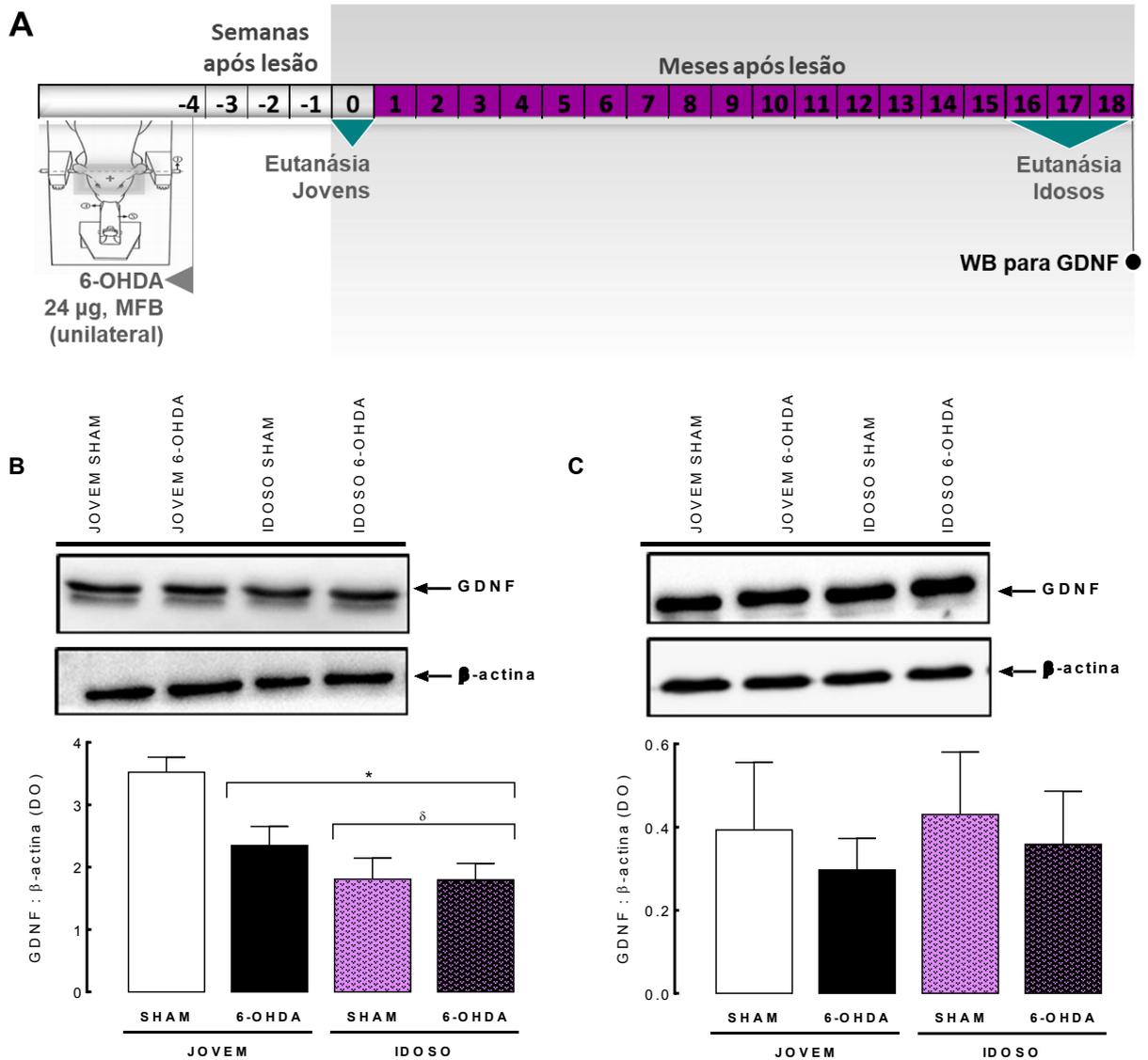


Legenda: (A) Desenho experimental indicando o período de eutanásia com posterior quantificação do CDNF. (B) Os níveis de CDNF estriatais foram quantificados a partir da técnica de ELISA em animais jovens (4 meses de idade) e idosos (20-22 meses). Os resultados são expressos como média ± e.p.m. (n = 6/grupo); * $p \leq 0,05$ vs. JOVEM; teste t de *Student* unicaudal para amostras independentes.

6.4.1.2 Níveis do GDNF quantificados através da técnica de Western Blotting no estriado e na SN de animais jovens e idosos lesionados com 6-OHDA no MFB

Adicionalmente à quantificação dos níveis estriatais do GDNF, foi mensurado o imunocnteúdo do GDNF através da técnica de Western Blotting em animais idosos (20-22 meses de idade) e jovens (4 meses) lesionados com a 6-OHDA no MFB (**Figura 34A**). A quantificação do GDNF foi realizada tanto no estriado, quanto na SN. Para o estriado, a ANOVA de medidas repetidas demonstrou uma diferença estatística para o fator idade ($F_{1,16} = 15.4, p < .001$), prosseguindo a análise com o teste post-hoc de Newman Keuls caracterizou-se um efeito de redução dos níveis do GDNF não somente em decorrência do envelhecimento, como da própria lesão com a 6-OHDA no MFB de animais jovens ($p < .01$ vs. jovem SHAM) (**Figura 34B**). Enquanto na SN não houveram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais avaliados, independente da presença de lesão ou do envelhecimento, como indicado pelo fator interação na ANOVA de duas vias ($F_{1,16} = .0, p = ns$) (**Figura 34C**).

Figura 34: Efeito do envelhecimento sobre os níveis do GDNF em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB.



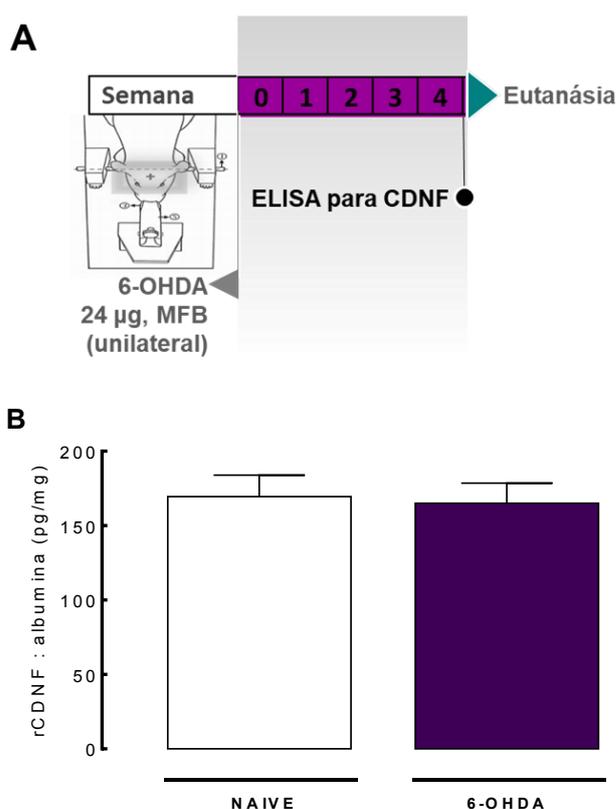
Legenda: (A) Desenho experimental indicando o período de eutanásia com posterior quantificação do GDNF. (B) Os níveis de GDNF estriatais e (C) na SN foram quantificados a partir da técnica de Western Blotting em animais jovens (4 meses de idade) e idosos (20-22 meses) lesionados com 6-OHDA no MFB. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. ($n = 5/\text{grupo}$); $*p \leq 0,05$ vs. JOVEM SHAM, $\alpha p \leq 0,05$ vs. JOVEM (fator idade); ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman Keuls. MFB: do inglês *medial forebrain bundle*; WB: Western Blotting (A).

6.4.2 Influência da DP sobre os níveis de NTFs

6.4.2.1 Níveis do CDNF no estriado de animais naive e lesionados com 6-OHDA no MFB através da técnica de ELISA

Mais do que avaliar os níveis de CDNF e GDNF frente ao envelhecimento, intuiu-se quantifica-los em modelos animais da DP e em amostras encefálicas de pacientes parkinsonianos. Em relação ao modelo da DP utilizado para avaliação do efeito da administração i.n. do CDNF, além dos níveis de GDNF (acima mostrados, juntamente com a análise de influência do envelhecimento), quantificou-se os níveis CDNF através da técnica de ELISA (**Figura 35A**). A lesão com a 6-OHDA no MFB, apesar de ter reduzido o imunocontéudo estriatal do GDNF, não alterou os níveis estriatais do CDNF, como visto através do teste t de *Student* para amostras independentes ($t_9 = .22, p = .83$) (**Figura 35B**).

Figura 35: Efeito da lesão com a 6-OHDA no MFB sobre os níveis do CDNF.



Legenda: (A) Desenho experimental indicando o período de eutanásia com posterior quantificação do CDNF. (B) Os níveis de CDNF estriatais foram quantificados a partir da técnica de ELISA em animais *naive* e lesionados com a 6-OHDA no MFB. Os resultados são expressos como média \pm e.p.m. ($n = 6$ /grupo); teste t de *Student* para amostras independentes. MFB: do inglês *medial forebrain bundle* (A).

6.4.2.2 Análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis estriatais de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) em ratos eutanasiados em distintos tempos após lesão com 6-OHDA no MFB

Novamente, afim de reforçar e ampliar os achados de modulação dos níveis proteicos do GDNF e do CDFN frente à lesão com a 6-OHDA, a expressão gênica de alguns NTFs foi verificada a partir da análise do perfil de expressão diferencial utilizando-se bases de sequenciamento de RNAm. A análise de expressão diferencial foi realizada a partir de um conjunto de dados do *Gene Expression Omnibus* (GSE58710), o qual disponibiliza dados de microarranjos da SN de ratos machos Sprague-Dawley lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no estriado.

Os mesmos NTFs anteriormente avaliados, CDFN, GDNF, BDNF e NGF, foram testados na presente etapa. Para cada um dos alvos, calculou-se a variância frente a 6-OHDA em diferentes tempos pós-lesão (1, 2, 4, 6 e 16 semanas) vs. animais controles (SHAM da respectiva semana), bem como os tamanhos de efeito (**Tabela 3** e **Figura 36A**). De fato, dentre os genes diferencialmente expressos durante as semanas pós-lesão, os transcritos do GDNF e do BDNF foram os únicos dos NTFs avaliados a apresentar diferenças significativas em decorrência da lesão com a 6-OHDA ($p \leq .05$ vs. SHAM na respectiva semana) (**Tabela 3**). Como melhor visualizado na **Figura 36A**, a expressão de RNAm do GDNF 4 semanas pós-lesão com a 6-OHDA, apresenta-se cerca de 14% mais elevada do que em animais controle ($p \leq .05$). Enquanto o BDNF apresentou tamanho de efeito negativo próximo a 23 e 33%, respectivamente para as semanas 2 e 4 pós-lesão. Ou seja, de maneira geral, há uma modificação transitória na expressão do GDNF (positiva) e do BDNF (negativa) após uma lesão dopaminérgica com a 6-OHDA ($p \leq .05$).

Tabela 3: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB.

NTF	Grupo experimental	Diferença	valor de <i>p</i>
CDNF	6-OHDA : semana 1	1,14	.3377
	6-OHDA : semana 2	-1,00	.6322
	6-OHDA : semana 4	-1,04	.5896
	6-OHDA : semana 6	-1,02	.3694
	6-OHDA : semana 16	-1,06	.8495
GDNF	6-OHDA : semana 1	-1,09	.1688
	6-OHDA : semana 2	-1,04	.6010
	6-OHDA : semana 4	1,14	.0503 *
	6-OHDA : semana 6	1,11	.2598
	6-OHDA : semana 16	1,14	.1105
BDNF	6-OHDA : semana 1	-1,04	.5253
	6-OHDA : semana 2	-1,23	.0223 *
	6-OHDA : semana 4	-1,33	.0009 *
	6-OHDA : semana 6	-1,15	.1778
	6-OHDA : semana 16	-1,00	.4098
NGF	6-OHDA : semana 1	-1,05	.2588
	6-OHDA : semana 2	-1,09	.5806
	6-OHDA : semana 4	-1,09	.4585
	6-OHDA : semana 6	-1,04	.7262
	6-OHDA : semana 16	1,04	.4487

Legenda: Níveis estriatais dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF de animais lesionados com a 6-OHDA no MFB (n = 3/grupo). * $p \leq .05$ vs. SHAM (na respectiva semana).

6.4.2.3 Análise de expressão diferencial de microarranjos dos níveis de RNAm de diferentes NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF) na SN de pacientes com a DP classificada como leve, moderada e grave segundo o estadiamento de Braak

Por fim, com o objetivo de avaliar a expressão de NTFs de acordo com a progressão da DP, utilizou-se um conjunto de dados depositado no *Gene Expression Omnibus* (GSE49036) de amostras encefálicas de pacientes parkinsonianos em diferentes estágios da doença. Todos os indivíduos foram avaliados neuropatologicamente por especialistas e classificados de acordo com o estadiamento de Braak para a presença da α -sinucleína, em estágios de 0 a 6. Para a análise do perfil de expressão diferencial dos NTFs avaliados (CDNF, GDNF, BDNF e NGF), foram utilizadas amostras da SN de pacientes agrupados de acordo com os estágios definidos por Braak: 1 e 2 = pacientes com DP leve, 3 e 4 = DP moderada e 5 e 6 = DP grave e comparou-se com indivíduos sem patologias neuropsiquiátricas ou presença da α -sinucleína (Braak = 0).

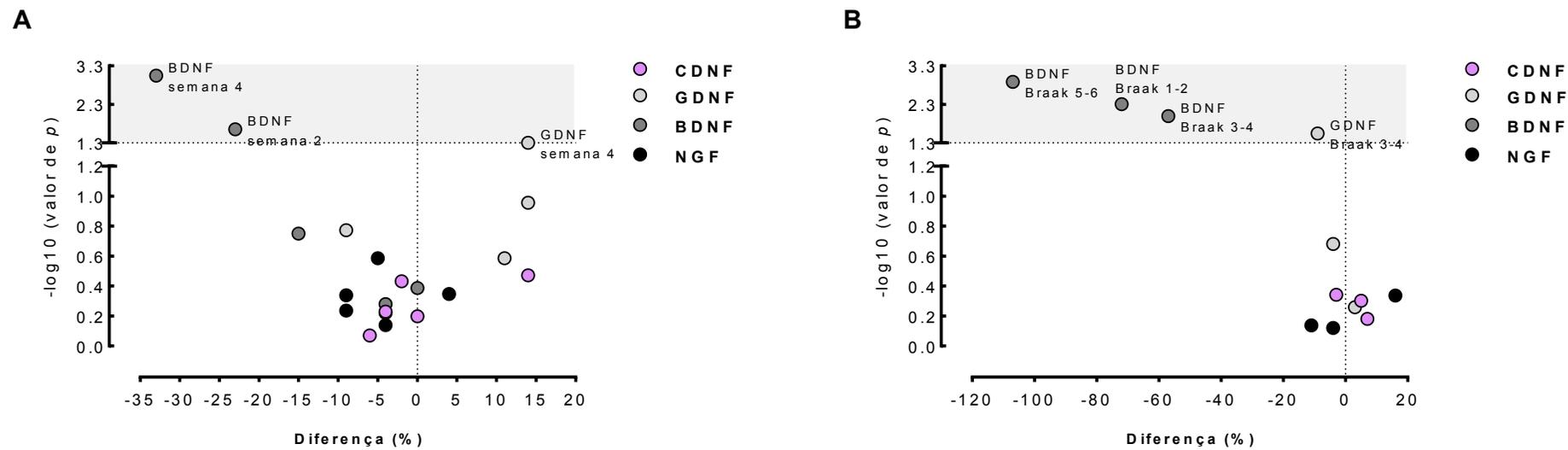
Corroborando com os dados do modelo animal da DP (acima apresentados), apenas o GDNF e o BDNF tiveram seu perfil de transcrição alterado nos pacientes parkinsonianos ($p < .05$ vs. Braak = 0) (**Tabela 4**). Para o GDNF as mudanças de expressão do RNAm ocorreram apenas de maneira transitória, em estágios moderados da DP, apresentando cerca de 9% de redução nos níveis de seus transcritos. Todavia, foi novamente o BDNF que apresentou as alterações mais significativas, desde estágios iniciais da DP até os estágios mais avançados. Os tamanhos de efeito negativo para o BDNF foram realmente expressivos, com reduções nos níveis dos transcritos de 72, 57 e 107%, respectivamente para o estadiamento de Braak 1-2, 3-4 e 5-6. Na **Figura 36B** podem ser melhor visualizadas a magnitude das alterações no perfil de transcritos dos NTFs avaliados.

Tabela 4: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em pacientes com a DP.

NTF	Grupo experimental	Diferença	valor de <i>p</i>
CDNF	Estágio de Braak 1-2	1,07	.6591
	Estágio de Braak 3-4	-1,03	.4546
	Estágio de Braak 5-6	1,05	.4985
GDNF	Estágio de Braak 1-2	1,03	.5520
	Estágio de Braak 3-4	-1,09	.0284 *
	Estágio de Braak 5-6	-1,04	.2085
BDNF	Estágio de Braak 1-2	-1,72	.0049 *
	Estágio de Braak 3-4	-1,57	.0101 *
	Estágio de Braak 5-6	-2,07	.0013 *
NGF	Estágio de Braak 1-2	-1,11	.7271
	Estágio de Braak 3-4	-1,04	.7568
	Estágio de Braak 5-6	1,16	.4612

Legenda: Níveis dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF de pacientes com a DP em diferentes estágios de acordo com o estadiamento de Braak (n = 5-8/grupo). * $p \leq .05$ vs. Braak = 0.

Figura 36: Análise de expressão diferencial dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF em animais lesionados com a 6-OHDA e em pacientes com a DP.



Legenda: Níveis de expressão dos transcritos de genes do CDNF, GDNF, BDNF e NGF na (A) SN de animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no estriado e (B) pacientes com a DP em diferentes estágios de acordo com o estadiamento de Braak ($n = 5-8/\text{grupo}$). A parte hachurada do gráfico representa o limiar de significância ($p \leq .05$ ou $-\log_{10} \approx 1.3$); teste t de *Student vs.* Braak = 0.

7 DISCUSSÃO

O maior desafio na terapêutica da DP trata-se, indubitavelmente, do desenvolvimento de um tratamento que impeça ou retarde a progressão do processo neurodegenerativo. A realidade atual, de pacientes parkinsonianos fadados ao controle paliativo de uma parcela dos sintomas e limitado ao avanço da neurodegeneração, instiga a busca por terapias que hajam sobre os mecanismos subjacentes à morte celular. Nessa conjuntura, as terapias baseadas no uso de NTFs representam um meio promissor de se modificar do curso natural da DP. Considerando-se a amplitude de efeitos que os NTFs exercem sobre a homeostasia de populações celulares, eles vêm sendo amplamente estudados em doenças neurodegenerativas, como a DP (OBESO et al., 2017).

Todavia, apesar do potencial terapêutico extensivamente demonstrado em ensaios pré-clínicos, o insucesso observado na grande maioria dos ensaios clínicos com NTFs em pacientes com a DP, reflete os vários obstáculos confrontados na busca por terapias modificadoras do curso da doença. Os fatores limitantes evidenciados na terapia com NTFs na DP, são na verdade, similares aos de muitos outros distúrbios do SNC. O desenvolvimento de novas drogas nessa área apresenta desafios únicos quando comparado com doenças de outros sistemas, devido: a uma compreensão incompleta da biologia das condições multifacetadas do SNC, a escassez de modelos animais clinicamente relevantes para testar novas drogas e, em especial, a presença da BHE que restringe o fluxo de moléculas para o cérebro (DANON; REEKIE; KASSIOU, 2019).

A BHE tem sido um obstáculo para o desenvolvimento de terapias direcionadas ao SNC, dificultando o uso clínico de proteínas promissoras no tratamento de doenças neurodegenerativas (ALY, A. E.; WASZCZAK, B. L., 2015). À exemplo, na terapia com NTFs a passagem pela BHE surge como uma das principais limitações do tratamento de condições patológicas à nível de SNC. Atualmente, para a administração de NTFs em doenças do SNC são necessários métodos cirúrgicos para acesso à região-alvo, tornando a terapia limitada a uma fração dos pacientes dado o grau de invasividade do método e seu alto custo. Portanto, a partir da busca por novas abordagens que permitam a passagem dessas proteínas com potencial terapêutico através da BHE, tem-se investido na otimização dos protocolos de entrega dos NTFs. Por exemplo, a partir de meios que propiciem a utilização de vias de acesso periféricas para administração dos NTFs, universalizando o tratamento entre os pacientes com a DP de maneira eficaz e segura (LANG, ANTHONY E.; ESPAY, ALBERTO J., 2018).

Dentre os meios para transpor macromoléculas através da BHE de maneira não-invasiva, a administração pela via i.n. configura a estratégia mais promissora na atualidade. A cavidade nasal representa uma via de acesso direto ao SNC capaz de contornar a restrição do fluxo de moléculas imposta pela BHE e, neste sentido, o transporte de biomoléculas através da administração i.n. tem sido bem-sucedido para uma variedade de condições patológicas que afetam o SNC (BANKS, 2016). A pesquisa com a administração i.n. de NTFs na DP encontra-se em fase pré-clínica de desenvolvimento e assim como nos demais âmbitos da pesquisa com NTFs na DP, o GDNF trata-se do protagonista neste cenário (ALY et al., 2019; HERNANDO et al., 2018; MIGLIORE et al., 2014; YUE et al., 2017). Além do GDNF, se tem sabido que o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF, do inglês: *basic fibroblastic growth factor*) foi avaliado em um modelo animal da DP (ZHAO et al., 2014). De forma que, este é o primeiro trabalho que demonstra os efeitos da administração i.n. do CDNF; o mais recente NTF caracterizado e que tem ganho a atenção devido sua capacidade de distribuição no tecido cerebral e, principalmente, devido sua ação pleiotrópica sobre diversos mecanismos envolvidos na fisiopatologia da DP (HUTTUNEN; SAARMA, 2019).

Além de ser um documento com resultados pioneiros sobre os efeitos da administração por via i.n. do CDNF, diversos outros aspectos ainda não avaliados no contexto da pesquisa pré-clínica com NTFs foram levados em consideração na execução experimental desta tese. Inicialmente, essa estratégia foi testada em um modelo animal de lesão que simula o estágio avançado da DP, analisando-se parâmetros da função motora e não motora durante 32 semanas após a administração i.n. do CDNF. Além disso, verificou-se a viabilidade da administração i.n. crônica do CDNF; bem como, o efeito de sua associação ao tratamento padrão da DP e sobre as LIDs.

Além do modo de entrega e liberação dos NTFs ao SNC, a terapia com NTFs na DP apresenta pelo menos uma dezena de limitações a mais que podem estar refletindo diretamente no seu insucesso quando testada em pacientes parkinsonianos. Sobretudo, pesquisadores das áreas pré-clínica e clínica devem analisar a conjuntura sobre um amplo espectro, buscando aprimorar sua conduta experimental e minimizar os desacertos na translação dos dados. Dado a sequência de resultados insatisfatórios em ensaios clínicos, essa discussão envolvendo as incoerências e desafios existentes em cada um dos eixos da pesquisa com NTFs e DP tem sido cada vez mais frequente na literatura e destaca-se a importância de se ampliar a avaliação de aspectos funcionais do tratamento (LANG, A. E.; ESPAY, A. J., 2018; RODRIGO et al., 2018; RODRIGUES et al., 2014).

Por exemplo, a grande maioria das pesquisas pré-clínicas com NTFs em modelos da DP carece de uma análise ampla e robusta, tornando-as insensíveis à detecção de modificações no quadro clínico global e, por conseguinte, irreprodutíveis na clínica devido à precariedade dos desfechos pré-estabelecidos. De maneira geral, as pesquisas em modelos animais têm avaliado apenas o efeito do NTF sobre a neurodegeneração dopaminérgica. Seja a partir da avaliação *in vivo* através do teste de rotação com apomorfina ou anfetamina; e/ou *post-mortem* a partir de imunohistoquímica para TH; ignorando possíveis efeitos funcionais (RODRIGO et al., 2018).

A realidade atual da pesquisa investigando o potencial do CDFN em modelos animais da DP, é exemplo claro desse fato. De todos os trabalhos presentes na literatura, a avaliação comportamental dos animais se limitou ao teste de rotação com drogas dopaminérgicas em cerca de 60% dos casos (BÄCK et al., 2013; CORDERO-LLANA, O. et al., 2015; JIANG, MEI; NIU, CHAOSHI, 2015; LINDHOLM, P. et al., 2007; MEI, J.; NIU, 2015a; VOUTILAINEN, M. H. et al., 2011; VOUTILAINEN, MERJA H. et al., 2017; WANG, LIZHENG et al., 2017). Poucos foram os trabalhos que fizeram uma avaliação adicional de parâmetros da função motora. Limitando-se a medida da atividade locomotora em dois dos trabalhos (AIRAVAARA et al., 2012; REN, X. et al., 2013), ao teste do cilindro (HUOTARINEN, A. et al., 2018), ao teste da caminhada e teste de catalepsia na barra (NASROLAHI et al., 2019) e uma avaliação geral mais ampla ocorreu apenas em um modelo de primatas não-humanos (avaliando-se o reflexo sensitivo do membro, a lateralidade, a atividade locomotora, a marcha e o tremor) (GAREA-RODRIGUEZ et al., 2016). Em um dos estudos investigando o potencial do CDFN em modelos da DP, não foi avaliado quaisquer parâmetros funcionais ou de efeito sobre a neurodegeneração dopaminérgica (NADELLA et al., 2014b). Com exceção deste último, todos esses trabalhos avaliaram o efeito do CDFN sobre a neurodegeneração dopaminérgica na SN e/ou níveis de DA estriatais e, de maneira geral, o efeito neuroprotetor e/ou restaurador do CDFN foi evidenciado em praticamente todos estes trabalhos citados.

Contudo, diversos ensaios clínicos em pacientes com DP tratados com NTFs, visualizaram efeitos positivos sobre a eficiência do sistema dopaminérgico (com auxílio da PET ou na análise *post-mortem*), sem que isso repercutisse em benefícios clínicos funcionais em escalas para avaliação motora e não motora. Isso reflete a necessidade de que se enriqueça as análises pré-clínicas, avaliando adequadamente o máximo de desfechos e efeitos decorrentes do tratamento (RODRIGO et al., 2018).

A despeito dessa questão, no primeiro protocolo experimental do atual trabalho, com duração de 32 semanas após a administração i.n. do CDNF nas doses de 10, 50 ou 100 µg, fez-se uma extensiva avaliação do desempenho motor dos animais lesionados com a 6-OHDA no MFB. Os paradigmas utilizados permitiram o acesso aos mais distintos espectros do sistema neurológico motor dos animais. De um modo geral, os testes motores aqui executados para a avaliação do efeito neurorestaurador do CDNF i.n., podem ser divididos em: gerais; de atividade locomotora; de coordenação motora e equilíbrio; e de avaliação do desempenho dos membros frente à lesão unilateral com a 6-OHDA.

Especificamente através do teste do rotarod, pode-se verificar que a lesão dopaminérgica induzida pela 6-OHDA ocasionou um prejuízo na coordenação inter-membros e no equilíbrio dos animais, o qual foi revertido pela administração i.n. do CDNF desde a menor dose testada. Além disso, a lesão dopaminérgica prejudicou o desenvolvimento e aprendizado de uma nova habilidade motora, as quais são regidas pelos gânglios basais (BUITRAGO et al., 2004). Pois durante os 8 meses de avaliação no teste do rotarod, com treinamento e repetições semanais, os animais lesionados com a 6-OHDA não apresentaram nenhuma melhora no seu desempenho durante o decorrer das sessões. Enquanto os animais tratados com o CDNF i.n. (10, 50 ou 100 g) apresentam um ganho de função em relação basal, chegando a um platô que se manteve até o final do protocolo. Até então, nenhum trabalho havia avaliado o efeito do CDNF sobre tais habilidades motoras. Contudo, Hernando e colaboradores, utilizando a abordagem de administração pela via i.n. para o GDNF, também demonstraram que administração i.n. do NTF resultou em melhoras no desempenho e aprendizado motor no teste do rotarod em um modelo de lesão dopaminérgica induzido pelo MPTP (HERNANDO et al., 2018).

Em decorrência de uma depleção prosencefálica unilateral de DA, a presença de um viés postural pode ser evidenciado a partir de comportamentos assimétricos no uso dos membros (BROOKS; DUNNETT, 2009). Neste trabalho, este prejuízo foi evidenciado em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA no MFB, através do teste do cilindro. A menor proporção de apoios com a pata prejudica devido a lesão dopaminérgica de um dos hemisférios cerebrais, foi revertida pela administração i.n. do CDNF nas doses de 10 e 100 µg. Enquanto a menor dose do CDNF i.n. foi efetiva apenas em períodos iniciais pós-administração i.n. (4 semanas), a maior dose do CDNF apresentou efeito sustentado no teste (durante 16 semanas). O efeito restaurador do CDNF sobre a assimetria motora no teste do cilindro, foi também demonstrado em uma abordagem recente que se baseou na associação da administração

intranigral do CDNF na dose de 10 µg à estimulação cerebral profunda do núcleo subtalâmico (STN HFS) em animais lesionados unilateralmente com a 6-OHDA (10 µg) no MFB. Este efeito foi evidenciado, 1 e 3 semanas após a administração do NTF, não se mantendo após 6 semanas (HUOTARINEN, A. et al., 2018), semelhantemente ao efeito obtido com a utilização da menor dose testada do CDNF i.n. (10 µg).

A estabilidade estática e dinâmica representam fenômenos distintos, contudo, um prejuízo de ambos é preponderante para a marcha alterada evidenciada na DP. O padrão de marcha envolve aspectos biomecânicos de equilíbrio e de controle postural que estão estreitamente relacionados com o risco de quedas evidenciado em fases avançadas da DP. Em indivíduos com a DP, a instabilidade postural com risco de quedas ocorre, sobretudo, nas situações de mudança de direção e velocidade, onde há a transição de uma habilidade postural dinâmica para estática (MONTEIRO et al., 2017). Sendo assim, além dos efeitos evidenciados sobre a estabilidade dinâmica no teste do rotarod, os resultados obtidos no teste de equilíbrio na barra horizontal, 15 semanas após a administração do CDNF i.n., fornecem dados sobre um dano de maior intensidade, visualizados através de parâmetros de estabilidade estática. Nesse cenário, constatou-se que os animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, apresentaram uma tendência a um maior risco de quedas, sendo esse prejuízo ausente nos animais tratados com o CDNF i.n. De forma que, a administração i.n. do CDNF parece, portanto, estar relacionada com benefícios em ambos os fenômenos de estabilidade, dinâmica e estática.

Apesar da representatividade dos problemas de marcha, uma das queixas mais frequentes dos pacientes com DP desde os estágios iniciais é o comprometimento da destreza manual. Esse comprometimento pode contribuir para a sobrecarga da doença, dificultando a realização das atividades de vida diária e resultando no aumento da dependência com redução da qualidade de vida. A destreza manual refere-se a capacidade de manipular habilmente objetos e requer para isso o controle de habilidades motoras finas em movimentos mais precisos e delicados, onde há a necessidade de coordenação de pequenos músculos, além da percepção visual (LAHR et al., 2015). A partir do teste do adesivo, pode-se constatar que os animais lesionados com a 6-OHDA apresentam um prejuízo na capacidade proprioceptiva e no componente motivacional da acinesia, levando um maior tempo para percepção e retirada dos adesivos de suas patas. Enquanto, o tratamento com o CDNF i.n., especialmente na maior dose testada de 100 µg, foi capaz de amenizar esse prejuízo de habilidades motoras finas, o que em última instância, poderia estar relacionado a benefícios na destreza manual.

Em pacientes parkinsonianos, além dos sinais e sintomas cardinais, parâmetros locomotores habituais, como o andar livre ou a ultrapassagem de um obstáculo, são utilizados em escalas clínicas tradicionais e elas apontam uma taxa anual de progressão maior do que outros parâmetros, como o tremor (VITORIO et al., 2014). A exploração desse perfil comportamental dos animais foi realizada a partir do teste do campo aberto. Nele, constatou-se que a lesão com a 6-OHDA levou a uma drástica redução na atividade locomotora dos animais e, novamente, o tratamento com a maior dose de CDNF (100 µg) foi capaz de reverter parcialmente esse prejuízo, 16 semanas após sua administração i.n. Nos parâmetros secundários analisados no teste do campo aberto, a administração i.n. do CDNF não foi capaz de reverter danos quanto à velocidade máxima atingida e o aumento no número de rotações ipsilaterais dos animais. Todavia, os dados obtidos como desfecho primário do teste, corroboram com trabalhos da literatura que apontam uma maior atividade locomotora frente à administração intraestriatal do CDNF (AIRAVAARA et al., 2012; REN, X. et al., 2013). Airavaara e colaboradores, demonstraram um efeito neuroprotetor e restaurador da administração intraestriatal bilateral de CDNF (10 µg) em animais lesionados com a toxina dopaminérgica MPTP. O aumento da atividade locomotora horizontal e vertical dos animais foi evidenciado durante 24h de avaliação, duas semanas após a abordagem neuroprotetora e um dia após a estratégia neurorestauradora (AIRAVAARA et al., 2012). Enquanto, Ren e colaboradores, administraram via intraestriatal um vetor viral para expressão gênica do CDNF (AAV2-CDNF) e visualizaram efeito neurorestaurador sobre a atividade locomotora 8 semanas depois, os animais foram lesionados com a 6-OHDA unilateralmente no estriado (18 µg) (REN, X. et al., 2013). Estes distintos trabalhos, demonstram a reprodutibilidade do efeito do CDNF sobre prejuízos da atividade locomotora, uma vez que utilizando diferentes modelos de lesão, com diferentes níveis de comprometimento dopaminérgico e estratégias de administração do NTF, manteve-se o efeito neuroprotetor e/ou restaurador.

Apenas um trabalho na literatura avaliou o efeito do CDNF a longo prazo, como o aqui realizado. Ren e colaboradores, visualizaram os efeitos positivos do AAV2-CDNF sobre as rotações induzidas por anfetamina, até 54 semanas após a administração do vetor viral (REN, X. et al., 2013). Para avaliação do efeito a longo prazo da administração i.n. do CDNF, os animais foram acompanhados por 32 semanas. Contudo, foi investigado seu potencial em diferentes habilidades motoras na fase final do protocolo, através do teste da descida em barra vertical, teste da caminhada em escada horizontal e teste da pegada, respectivamente, nas semanas 20, 25 e 30 pós-administração do CDNF i.n.

Um parâmetro motor particularmente interessante de avaliar-se em um modelo da DP, trata-se da bradicinesia. A bradicinesia refere-se a lentidão para execução dos movimentos e faz parte da tríade de sintomas cardinais da DP (MEREDITH; KANG, 2006). O teste da descida em barra vertical, realizado 20 semanas depois da administração i.n. do CDFN, além de verificar as questões posturais de equilíbrio, fornece parâmetros sobre a bradicinesia dos animais, bem como a acinesia (que se refere a dificuldade de iniciação de um determinado movimento). No teste, constatou-se que os prejuízos causados pela lesão com a 6-OHDA no MFB, com maior latência para iniciar e concluir a tarefa, foram revertidos pela administração i.n. do CDFN em todas as doses testadas (10, 50 e 100 µg). Este perfil de melhora da bradicinesia e acinesia com a administração do CDFN, foi visto também por Nasrolahi e colaboradores. Trata-se da mais recente publicação com o CDFN em um modelo da DP, nele os animais foram lesionados unilateralmente com a 6-OHDA (10 µg) no estriado e administraram-se o CDFN na zona subventricular (SZV) como uma estratégia neurorestauradora (2 semanas após a lesão). O efeito do CDFN foi então avaliado por 3 semanas após a sua administração, no teste da catalepsia (dificuldade de um animal corrigir uma postura imposta externamente) e no teste caminhada na barra horizontal, sendo que ambos fornecem medidas da acinesia do animal e neste último também da bradicinesia. Os resultados demonstraram tais parâmetros foram modificados pela lesão e que já após duas semanas do tratamento com o CDFN na SZV, houve uma reversão parcial desse prejuízo (NASROLAHI et al., 2019), indicando que desde fases iniciais provavelmente poderiam ter sido evidenciados efeitos da administração i.n. do CDFN sobre esses parâmetros da função motora.

As últimas avaliações da função motora, realizadas com o intuito de verificar o efeito a longo prazo do CDFN administrado por via i.n., abrangeram vários aspectos de habilidades motoras através do teste da caminhada em escada horizontal e do teste da pegada. De maneira geral, esses testes refletem a coordenação motora dos animais concomitantemente à precisão da marcha (SCHÖNFELD et al., 2017). Nenhum trabalho presente na literatura investigando o efeito do CDFN ou da administração i.n. de NTFs em modelos da DP, até então, havia avaliado o perfil de marcha dos animais; tão pouco, em uma avaliação a longo prazo, após cerca de 7 meses da administração do NTF.

Os resultados obtidos nesses testes demonstraram um perfil inesperado de resposta. Enquanto no teste da caminhada em escada horizontal os animais tratados com as duas menores doses do CDFN i.n. (10 e 50 µg) apresentaram um efeito positivo, reduzindo o tempo para travessia do aparato e conclusão da tarefa; no teste da pegada, apenas a maior dose do CDFN

i.n. testada (100 µg), foi capaz de amenizar os prejuízos de marcha evidenciados por um aumento no tamanho da passada da pata ipsilateral à lesão (apesar de haver uma tendência nas doses menores). Tais efeitos, foram vistos 25 ou 30 semanas após a administração i.n. do CDNF e, de maneira geral, foi nesses testes onde evidenciou-se de forma mais modesta o efeito da administração i.n. do CDNF sobre os prejuízos da função motora ocasionados pela lesão com a 6-OHDA. Assim, não se descarta a possibilidade de que a longo prazo o CDNF administrado por via i.n. tenha seus efeitos reduzidos sobre os danos à função motora.

Inclusive, fenômeno semelhante já foi visto a partir do teste de rotação com anfetamina, onde uma única administração do CDNF, teve seu efeito reduzido com o passar do tempo, indicando um possível avanço da neurodegeneração ou de parâmetros subjacentes à morte neuronal (CORDERO LLANA et al., 2014; HUOTARINEN, A. et al., 2018). Nesses trabalhos, apesar de um efeito cumulativo geral positivo, as avaliações semanais deixam claro que com o tempo teve-se um aumento gradativo do prejuízo, em 8 semanas (CORDERO LLANA et al., 2014) ou 9 semanas após a administração intraestriatal do CDNF (HUOTARINEN, A. et al., 2018), na forma de AAV2-CDNF ou combinado com a STN HFS, respectivamente. De qualquer forma, destaca-se que em relação à aspectos de cronicidade, o CDNF administrado por via i.n. teve um efeito significativamente superior sobre a função motora do que quaisquer outros tipos de abordagens já avaliadas no contexto da DP com a utilização do CDNF.

Todavia, a sintomatologia motora evidenciada em pacientes com a DP trata-se de um dos aspectos de um transtorno multifacetado e complexo. Muito antes da fase inicial da DP, que é onde geralmente se tem o diagnóstico clínico pela tríade clássica de sintomas motores (bradicinesia, tremor de repouso e rigidez muscular) e está associado com altos níveis de neurodegeneração dopaminérgica na SN e redução do conteúdo de DA estriatal, uma série de prejuízos não motores pode se fazer presentes (OBESO et al., 2017). Os sintomas não motores envolvem múltiplas funções, como: desregulação do ciclo sono-vigília; comprometimento cognitivo, incluindo déficits de memória, demência e alucinações; distúrbios de humor; disfunções autonômicas, principalmente constipação; bem como sintomas sensoriais, como a hiposmia e a dor. Essa gama de sintomas não motores é responsável por reduzir consideravelmente os escores de qualidade de vida dos pacientes com DP, particularmente na fase avançada da doença (POEWE et al., 2017b). Nessa perspectiva, investigamos de maneira pioneira o potencial da administração i.n. do CDNF sobre alterações não motoras em um modelo animal da DP avançada.

Os prejuízos cognitivos leves geralmente surgem no estágio inicial da DP e progridem progressivamente à demência em um estágio avançado. Com o objetivo de avaliar a função cognitiva dos animais tratados com o CDFN administrado por via i.n., acessou-se a memória operacional de curto prazo através do teste de alternância espontânea no labirinto em Y (HUGHES, 2004). No teste, foi observado um importante prejuízo na memória operacional dos animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, e de maneira inédita, demonstrou-se que 15 semanas após o tratamento com o CDFN i.n. houve a reversão total desse prejuízo cognitivo. A melhora da memória operacional foi observada em todas as doses do CDFN i.n. testadas (10, 50 e 100 µg). Ademais, o número de entradas nos braços fechados, valida o teste quanto a possíveis vieses de mobilidade.

Em relação ao benefício do CDFN sobre parâmetros cognitivos, Kemppainen e colaboradores (2015), avaliaram seus efeitos em um modelo transgênico da doença de Alzheimer. Neste trabalho, testou-se o efeito da injeção intrahipocampal do CDFN (10 µg) sobre a memória de animais com 12-13 meses de idade, duplo transgênicos para APP/PS1. Duas semanas após a administração do CDFN no hipocampo dos animais, verificou-se que a terapia com o NTF foi capaz de reverter prejuízos sobre a aprendizagem e a memória espacial observado nos animais transgênicos APP/PS1, através do teste do labirinto aquático de Morris. Análises estatísticas posteriores, demonstraram que a melhora cognitiva esteve diretamente correlacionada com aumento nos níveis do CDFN evidenciados no hipocampo dos animais, independentemente de modificações na neurogênese hipocampal ou dos níveis da proteína amiloidogênica A β . Além disso, em uma versão modificada do teste de reconhecimento de objetos, foi possível constatar um efeito positivo do CDFN intrahipocampal sobre a memória de longo prazo dos animais; inclusive, com efeito per se (KEMPPAINEN et al., 2015). Dentre os ensaios clínicos com NTFs na DP, foram escassos os que demonstraram resultados funcionais positivos em razão do tratamento com o NTF e mesmo nestes, o aumento nos escores de pontuação da escala de avaliação UPDRS foi referentes à sintomatologia motora e às atividades desempenhadas na vida diária (GILL, S. S. et al., 2003; MARKS, W. J. et al., 2008; PATEL, N. K. et al., 2005; SLEVIN et al., 2007; SLEVIN et al., 2005). Nenhum ensaio clínico com NTFs, até então, demonstrou benefícios na escala de avaliação dos sintomas referentes ao estado mental (escala 1 da UPDRS). Nesse âmbito, efeitos positivos do CDFN poderiam ter um impacto grandioso, inclusive sobre o ensaio clínico em aberto que atualmente encontra-se em execução e tem entre seus desfechos primários avaliações cognitivas com escalas específicas (HUTTUNEN; SAARMA, 2019). Os resultados obtidos com a administração i.n. do CDFN

demonstrando melhora da memória de procedimento em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, vêm a somar no campo de evidências positivas.

O labirinto em cruz elevado é um dos testes comportamentais mais utilizados para o estudo experimental de drogas ansiolíticas. Validado farmacologicamente e fisiologicamente, o modelo explora o conflito entre a tendência inata de roedores em explorar ambientes novos e a aversão natural a altura e espaços abertos (BLANCHARD; GRIEBEL; BLANCHARD, 2001). Nessa conjuntura, o parâmetro de porcentagem de tempo nos braços abertos, nos permite considerar um efeito ansiolítico do CDNF, 15 semanas após a sua administração i.n. nas doses de 50 e 100 µg, em relação aos animais lesionados com a 6-OHDA. Igualmente ao teste anterior, o número de entradas nos braços fechados não diferiu entre os grupos, validando o teste quanto a questões de mobilidade. A ansiedade é um dos sintomas que aparecem ainda na fase prodrômica da DP, apesar de uma redução no tempo nos braços abertos, que indicaria um comportamento do tipo-ansio gênico nos animais lesionados com a 6-OHDA, esse parâmetro não foi estatisticamente alterado em nosso modelo de lesão no MFB.

A ausência de modificações no perfil de respostas de ansiedade de animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, apesar de controversa, já foi previamente constatada por outros autores (CARVALHO et al., 2013; ESKOW JAUNARAJ; GEORGE; BISHOP, 2012). Todavia, ainda que os resultados sobre o estado ansioso dos animais tratados com CDNF por via i.n. encontrem-se comprometidos em decorrência do modelo de lesão utilizado; recentemente, Chen e colaboradores (2019), avaliaram o efeito do CDNF sobre o perfil ansioso de peixe-zebra mutantes, com ausência do NTF. Nesse trabalho, dentre outros efeitos sobre o fenótipo comportamental, foi constatado que a ausência do CDNF gerou comportamento do tipo ansiolítico nos peixes (CHEN et al., 2019). Contudo, reitera-se que tal efeito foi visto na ausência de uma condição patológica, podendo apresentar variações sobre a presença de uma lesão dopaminérgica, por exemplo.

No contexto dos sintomas relacionados ao humor, além da ansiedade; a depressão e a apatia, frequentemente associadas à fase prodrômica e inicial da DP, respectivamente; apresentam alta prevalência e afetam significativamente a qualidade de vida dos pacientes (OBESO et al., 2017). Nesse contexto, é amplamente reconhecido a importância da DA no controle do humor, especialmente através da modulação exercida sobre a via mesolímbica (NESTLER; CARLEZON, 2006). Para a caracterização do estado hedônico em roedores, o teste da borrifada com sacarose é utilizado como um meio eficaz para visualizar-se o índice de autocuidado e o comportamento motivacional dos animais (MATHEUS et al., 2016). Assim,

após 30 semanas da administração i.n. do CDNF, realizou-se o teste da borrifada com sacarose com o intuito de verificar quaisquer modificações de emocionalidade com relação à apatia. No teste, os animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, apresentaram uma forte tendência ao comportamento do tipo-anedônico. Frente a esse perfil comportamental, a administração i.n. do CDNF, especialmente as doses de 10 e 100 µg, repercutiram em uma melhora substancial, com aumento significativo no índice de autocuidado de animais lesionados com a 6-OHDA.

Recentemente, Stepanova e colaboradores, apresentaram uma prévia de seus resultados no Congresso da *International Parkinson and Movement Disorder Society*, 2018. O grupo finlandês, coordenado por Mart Saarma e responsável pela caracterização do CDNF (LINDHOLM, P. et al., 2007), deve publicar em breve dados sobre o efeito da administração intracerebral do CDNF sobre uma variedade de comportamentos não motores avaliados em um modelo da DP. No resumo do trabalho levado ao Congresso, informou-se que o CDNF demonstrou efeitos positivos sobre praticamente todos os testes avaliados, como: memória aversiva condicionada ao contexto, teste do nado forçado e avaliações a respeito da motivação, memória e atividade geral dos animais monitorados em sua caixa moradia (*Intelligence system*®) (STEPANOVA et al., Effect of CDNF on non-motor symptoms like motivation, fear, stress and depression-like behavior [abstract]. *Mov Disord.* 2018). Tais resultados, corroboram com os achados positivos obtidos através da administração i.n. do CDNF sobre o perfil anedônico, assim como sobre a memória de animais lesionados com a 6-OHDA e juntos, representam os únicos dados avaliando o efeito do CDNF sobre a sintomatologia não motora em um modelo da DP.

Entre os sintomas não motores da DP, a perda de peso é comumente evidenciada dentre os pacientes. Porém, dada a gravidade superior dos demais sintomas, a redução do peso corporal acaba muitas vezes negligenciada sem que sejam prestadas grandes considerações sobre sua origem e manejo. A perda de peso sucede de um balanço energético negativo, o que significa que o gasto de energia excede a sua produção. Se a redução de peso está etiológicamente ligada à DP, ou é uma consequência dos próprios processos da doença, ainda é uma incógnita. O fato é que tal prejuízo tem sido frequentemente associado a problemas clínicos subsequentes no curso da doença, como desnutrição, quedas, fraturas ósseas, infecções, pronunciamento do declínio cognitivo e dos efeitos adversos pelas medicações padrões; resultando em uma piora global na qualidade de vida dos pacientes com DP (MA, K. et al., 2018). Tal sintoma foi observado em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, com uma redução de peso pronunciada, durante as 4 semanas após a lesão. Enquanto animais controle vinham

apresentando ganho de peso normal decorrente do desenvolvimento, aqueles lesionados com 6-OHDA apresentaram perfil semelhante somente ao final do presente protocolo. A reversão desse quadro pôde ser observada perante a administração de CDNF i.n. nas doses de 10 ou 100 µg, onde o ganho de peso de tais animais foi semelhante ao dos animais controle.

Além disso, desde os primeiros estudos com o GDNF em modelos da DP, seja em roedores (LAPCHAK et al., 1997), primatas não-humanos (ZHANG, Z. et al., 1997) e desde o primeiro ensaio clínico com o GDNF em pacientes com a DP (NUTT et al., 2003), foi demonstrado que um dos importantes efeitos adversos causados pela administração do NTF, tratava-se da elevada perda de peso (acompanhada ou não de anorexia). Nos anos seguintes, especialmente após suspensão do ensaio clínico devido à ausência de benefícios e efeitos adversos severos, a questão da perda de peso causada pelo GDNF começou a ganhar notoriedade nos estudos pré-clínicos. Inicialmente, acreditava-se que tal efeito seria mediado por outros circuitos fora dos núcleos da base, uma vez que em pacientes, o efeito foi reverenciado quando a administração do GDNF foi realizada pela via i.c.v. (NUTT et al., 2003) e não observado quando foi realizada a administração intraestriatal em um ensaio clínico subsequente (GILL, S. S. et al., 2003; PATEL, N. K. et al., 2005). Esse efeito poderia ser decorrido de uma estimulação hipotalâmica, através da ativação simpática no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, realmente, evidenciou-se que uma superexpressão de GDNF no hipotálamo de roedores, levava a perda de peso. Postulava-se que o MFB, que passa pelo hipotálamo lateral, poderia ser o responsável por mediar essa informação. Contudo, não foram encontradas quaisquer alterações bioquímicas e estruturais no hipotálamo que pudessem explicar esse efeito (TÜMER et al., 2006). Mais tarde, inclusive, verificou-se que a superexpressão de GDNF na SN levava a perda de peso superior à vista pela injeção do vetor de GDNF no hipotálamo (MANFREDSSON et al., 2009). Atualmente, ao mesmo tempo que tem sido testado a administração de GDNF em modelos de obesidade associada ao envelhecimento, ou obesidade induzida por dieta rica em gordura (MANFREDSSON et al., 2009; MWANGI et al., 2014); na DP, se tem investido em estratégias de se reduzir os efeitos adversos decorridos da terapia com o GDNF, por exemplo, através de abordagens com o encapsulamento do NTF (PAOLONE et al., 2019).

Assim, desde a caracterização do CDNF e seus primeiros testes em modelos animais da DP, se tem tido a cautela de observar se ele reproduziria esse efeito adverso visto no tratamento com o GDNF. Sobretudo, assim como demonstrado neste trabalho através de sua administração por via i.n., o CDNF não leva a redução de peso em modelos animais.

Corroborando com nossos dados, Huotarinen e colaboradores, compararam o efeito da administração intranigral do CDNF e do GDNF (ambos na dose de 100 µg) em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB; dentre outros efeitos, eles constataram que apenas o GDNF levou a redução do peso corporal dos animais (HUOTARINEN, ANTTI et al., 2018). Em nosso trabalho, inclusive, o CDNF i.n. levou a uma recuperação mais rápida da perda de peso decorrida da lesão, além da ausência do efeito adverso.

Visto os efeitos positivos da administração i.n. do CDNF sobre prejuízos motores e não motores, em um modelo animal da DP avançado, durante 32 semanas. Avaliar a segurança e tolerabilidade do tratamento com o NTF se tornara imprescindível. Além de acompanhar o surgimento de possíveis efeitos adversos durante esse extenso período, em que os animais foram eutanasiados com cerca de 12-13 meses de idade, acompanhou-se também o número de mortes naturais durante todo o protocolo. No entanto, assim como não foram evidenciadas mortes excessivas nesse período em decorrência da lesão com a 6-OHDA, também não foram evidenciados quaisquer efeitos quanto ao aumento no tempo de sobrevivência, por exemplo. Até então, não havia na literatura qualquer menção a respeito de potenciais riscos ou benefícios no tempo de sobrevivência de animais tratados com o CDNF, especialmente em um protocolo de longo prazo.

Esse conjunto de resultados demonstra o potencial do CDNF i.n. em atuar, de forma segura, sobre distintos aspectos funcionais da DP – tanto da função motora, quanto não motora; e, possivelmente, através da modulação de distintas regiões cerebrais e distintos sistemas de neurotransmissão. De fato, se tem sabido que a SN e o estriado não se referem às regiões cerebrais com maior expressão gênica e níveis proteicos do CDNF. Outras áreas como o tálamo/hipotálamo, cerebelo, corpo caloso ou globo pálido, possuem níveis do CDNF igualmente expressivos às regiões essencialmente dopaminérgicas (LINDHOLM, P. et al., 2007). Todavia, o papel e o modo de atuação do CDNF sobre outras áreas cerebrais e sistemas de neurotransmissão ainda é pouco explorado (HUTTUNEN; SAARMA, 2019). Recentemente, Chen e colaboradores, demonstraram a importância do CDNF sobre a regulação adequada dos sistemas de neurotransmissão histaminérgico, GABAérgico e glutamatérgico; e sua influência no desenvolvimento da epilepsia, por exemplo (CHEN et al., 2019). Tais evidências, somadas ao mecanismo de ação pleiotrópico e não convencional do CDNF (LINDAHL et al., 2017), demonstram o seu potencial terapêutico para o tratamento da DP.

Somada à descrição dos fenótipos motores e não motores, a subsequente análise das alterações neuropatológicas, é igualmente relevante em modelos da DP. A degeneração da DP

afeta principalmente neurônios mesencefálicos da via dopaminérgica nigroestriatal, que consiste no grupo de células dopaminérgicas A9, localizadas na SNc. Os axônios desses neurônios se estendem ao longo do MFB e projetam-se até o estriado dorsal. A degeneração dos neurônios dopaminérgicos é precedida e acompanhada de atrofia celular e uma perda substancial na expressão de TH, enzima passo-limitante na síntese de DA, resultando, assim, em uma redução nos níveis de DA estriatais (JELLINGER, 2012). Considerando ser imprescindível certificar-se o nível de lesão dopaminérgica em terapias que visem modificar o curso da doença, utilizamos a técnica de imunohistoquímica para imunodeteção de TH na SNc e estriado dos animais. Os resultados obtidos a partir da infusão unilateral da 6-OHDA na dose de 24 µg no MFB, indicam uma extensa lesão no lado ipsilateral à injeção da neurotoxina, com uma redução de cerca de 90% na imunomarcção para a TH na SNc dorsal e cerca de 80-75% nas fibras TH⁺ estriatais, respectivamente, nas regiões dorsal e ventral do estriado. Frente a essa neurodegeneração, a administração i.n. do CDFN, 4 semanas após a indução do modelo da DP com a 6-OHDA, evidenciou-se que além dos efeitos sobre a sintomatologia motora e não motora, o CDFN administrado via i.n. na dose de 100 µg aumentou significativamente a expressão de corpos neuronais TH⁺ da SNc. A neurorestauração parcial, de cerca de 50%, foi observada após 32 semanas da administração i.n. de CDFN. Curiosamente, a redução na neurodegeneração causada pela 6-OHDA evidenciada na SNc dorsal, foi acompanhada de uma modesta, mas significativa, redução da marcação para TH no estriado dorsal nos animais tratados com CDFN i.n. na dose de 100 µg. As demais doses de CDFN i.n. testadas, 10 e 50 µg, não apresentaram modificações quanto à marcação da TH no tempo e regiões analisadas.

Os resultados de neurorestauração obtidos com a administração i.n. do CDFN, se destacam dentre a literatura com NTFs em ensaios pré-clínicos para a DP por três principais motivos no contexto do modelo utilizado: (1) o CDFN i.n. foi capaz de restaurar neurônios dopaminérgicos em um modelo avançado da DP; (2) o CDFN i.n. apresentou resultados positivos sobre a neurodegeneração dopaminérgica mesmo após a lesão encontrar-se instaurada; (3) o CDFN i.n. apresentou efeito neurorestaurador a longo prazo, evidenciado após 8 meses de sua administração no modelo animal da DP avançada.

A 6-OHDA é um análogo de DA altamente oxidável que pode ser captada pelos transportadores de neurônios catecolaminérgicos. Três principais mecanismos têm sido propostos para explicar o seu efeito citotóxico: auto-oxidação; formação de peróxido de hidrogênio devido à ação da MAO-B; e inibição direta do complexo I da cadeia respiratória; conseqüentemente, resultando na morte celular. A gravidade dos sintomas obtidos no modelo

da 6-OHDA depende do local de injeção e da dose utilizada da neurotoxina. No modelo de lesão completa, a injeção da toxina no MFB leva a uma perda aguda e robusta dos neurônios dopaminérgicos na SNpc e do conteúdo do DA estriatal. Distintamente do que ocorre quando a toxina é administrada no estriado ou diretamente na SNc, reconhecidos como modelos de lesão parcial (CARVALHO et al., 2013; SIMOLA; MORELLI; CARTA, 2007).

Estima-se que quando há o surgimento dos sintomas motores e o diagnóstico definitivo, a maioria dos pacientes já apresente cerca de 50% de perda neuronal na SNc e em torno de 80% no estriado, segundo a marcação para TH (KORDOWER, JEFFREY H. et al., 2013). Dada a ausência de biomarcadores para o diagnóstico precoce, aliada ao fato de que a grande maioria dos pacientes possui uma boa resposta farmacológica à L-DOPA nas fases iniciais da DP e que o histórico dos participantes dos ensaios clínicos com NTFs seja de pacientes com a DP com grau de severidade entre moderado e grave (H&Y 3 – 4), torna-se imprescindível testar a terapia com NTFs também em fases avançadas da DP, utilizando modelos de lesão total que expressem essa realidade (RODRIGUES et al., 2014). Nesse sentido, com base nos critérios de validade de constructo, face e preditivo, o modelo de lesão total da 6-OHDA representa uma ferramenta capaz de mimetizar vários aspectos da DP avançada em animais. De forma que a lesão com 6-OHDA no MFB foi adotada no presente estudo para a avaliação do efeito do CDFN administrado por via i.n., justamente por mimetizar o estágio tardio de pacientes com a DP.

Além disso, grande parte da pesquisa pré-clínica atual baseia-se no uso das terapias modificadoras do curso da doença, como os NTFs, visando a proteção dos neurônios de uma futura lesão. No entanto, considerando que no momento em que um indivíduo é diagnosticado com DP já há uma vasta neurodegeneração em curso, a introdução desse paciente a uma terapia que busque neuroproteção apresenta baixa probabilidade de êxito. De maneira que, estratégias neuroprotetoras terão maior chance de sucesso caso sejam identificados biomarcadores para o diagnóstico precoce de pacientes com DP, por exemplo (LANG, A. E.; ESPAY, A. J., 2018). Portanto, a administração i.n. do CDFN foi testada em uma abordagem visando neurorestauração, com a administração do NTF somente após estabelecida a lesão dopaminérgica.

Uma última questão que diferencia nossos resultados com o CDFN dos demais, leva em conta o fato de que em alguns ensaios clínicos com NTFs em pacientes com a DP, a resposta foi obtida somente após um longo período da administração do NTF; a citar, Marks e colaboradores evidenciaram resultados positivos somente no subconjunto de pacientes tratados

durante a fase de extensão do estudo, após os 12 meses iniciais previstos (MARKS et al., 2010). Indicando que, não somente por questões de segurança e tolerabilidade, mas o tratamento e avaliação a longo prazo podem aumentar a sensibilidade à detecção dos efeitos dos NTFs de maneira geral (RODRIGO et al., 2018). Assim, de maneira inédita, acompanhamos o efeito da administração do CDNF por 32 semanas, com avaliações a longo prazo tanto dos efeitos *in vivo*, quanto *post-mortem*.

Atualmente, apenas dois estudos na literatura fornecem evidências sobre o efeito do CDNF em modelos de lesão avançada com a 6-OHDA sendo administrada no MFB (HUOTARINEN, A. et al., 2018; WANG, L. et al., 2017), assemelhando-se às condições de neurodegeneração observadas no protocolo de administração i.n. do CDNF. Ambos trabalhos foram realizadas dentro dos últimos dois anos, sendo as mais recentes pesquisas com o CDNF em modelos animais da DP; com exceção do trabalho de Nasrolahi e colaboradores, que demonstraram o efeito do CDNF quando administrado na SZV sobre o aumento da proliferação, sobrevivência e migração de células tronco e progenitoras neurais no estriado, em um modelo com infusão intraestriatal da 6-OHDA (NASROLAHI et al., 2019). Tornando evidente o redirecionamento da pesquisa para a avaliação dos efeitos do CDNF em modelos robustos de lesão, distinguindo-se de trabalhos prévios que demonstraram seus efeitos neuroprotetores e/ou neurorestauradores em modelos de lesões parciais (BÄCK et al., 2013; CORDERO-LLANA, O. et al., 2015; GAREA-RODRIGUEZ et al., 2016; JIAMING, MEI; NIU, CHAOSHI, 2015; LINDHOLM, P. et al., 2007; REN, X. et al., 2013; VOUTILAINEN, M. H. et al., 2011; VOUTILAINEN, M. H. et al., 2017).

Explorando as diferenças de protocolo e resultados obtidos nos demais trabalhos que avaliaram o efeito do CDNF sobre um modelo de lesão com administração da 6-OHDA no MFB, conseguimos notar a potencialidade da utilização da via i.n. para terapia com o CDNF. Wang e colaboradores (2017) utilizaram a terapia gênica como abordagem para aumentar a expressão de CDNF através do uso do vetor viral AAV8-CDNF ($2,8 \times 10^{13}$ v.g.) e a administração intraestriatal foi realizada em dois momentos distintos, 2 e 5 semanas após a lesão com a 6-OHDA (4 μ g) no MFB. Apesar de um efeito pronunciado com CDNF sendo administrado 2 semanas após a lesão (níveis médios da imunomarcção para TH passaram de 40% e 20%, respectivamente no estriado e SN, para cerca de 90% em ambas as regiões), em relação ao administrado 5 semanas após a lesão (níveis médios da imunomarcção para TH passaram de 40% e 20%, respectivamente no estriado e SN, para cerca de 70% em ambas as regiões), ambos reverteram parcialmente a neurodegeneração induzida pela 6-OHDA. Essa

avaliação foi realizada 17 semanas o início do protocolo, 15 ou 12 semanas após administração do NTF (WANG, L. et al., 2017). Nesse sentido, apesar da neurorestauração observada pela administração do CDFN i.n. na dose de 100 µg ter ocorrido em menor proporção (cerca de 50% na SN), a lesão gerada no atual protocolo com a 6-OHDA foi superior (cerca de 20-25% no estriado e 10% na SN). Ainda assim, o atual trabalho corrobora com os achados de Wang e colaboradores, demonstrando efeitos restauradores do CDFN em um modelo da DP.

No entanto, Huotarinen e colaboradores (2018), demonstram resultados conflitantes a esses. No protocolo desenhado por Huotarinen e colegas, a administração do CDFN intranigral foi realizada uma semana após a lesão, nas doses de 1, 3.3, 10, 33 e 100 µg nos animais lesionados com a 6-OHDA (10 µg) no MFB. Das doses testadas, somente a dose de 10 µg do CDFN apresentou efeito positivo e somente no teste de rotação com anfetamina, sem modificações na imunomarcagem para TH na SN e no estriado (HUOTARINEN, A. et al., 2018). Comparando os protocolos utilizados, há diferenças que possam justificar a discrepância de resultados. No trabalho de Wang e colaboradores (2017) a dose de 6-OHDA injetada foi inferior à de Huotarinen e colaboradores (2018), além da diferença de administração do vetor viral ou da proteína recombinante e das vias de entrega utilizadas, intraestriatal e intranigral. Sobretudo, ambas as doses de 6-OHDA são inferiores à utilizada neste trabalho, onde foi possível observar efeitos positivos do CDFN em diversos aspectos comportamentais assim como sobre a neurodegeneração, sobrelevando a utilização da via de administração i.n. como estratégia promissora para a terapia com o CDFN na DP avançada.

Juntamente com a neurorestauração, também foi demonstrado neste trabalho evidências de que a lesão com a 6-OHDA no MFB poderia repercutir em uma redução nos níveis estriatais do CDFN a longo prazo e que o tratamento com o CDFN i.n. na dose de 100 µg seria capaz de reverter essa redução do NTF, sem alterações visíveis na SN. Esses indícios partem de uma imunohistoquímica realizada 8 meses após o protocolo de administração i.n. do CDFN; todavia, dado o pequeno número amostral testado, são necessárias análises complementares para comprovar tal resultado.

O conceito de terapia de neurorestauradora para DP é baseado em estudos clínicos e de PET demonstrando que (1) na fase inicial da doença, quando há o surgimento dos sintomas cardinais, se tem uma redução de cerca de 80% no conteúdo de DA no estriado, mas cerca de 50% das células DA nigrais encontram-se viáveis; e, em especial, que (2) a redução dos marcadores de degeneração dopaminérgica no estriado progride progressivamente durante o passar dos anos com a doença, enquanto a lesão pré-estabelecida na SN presente desde a fase

inicial, se mantém consideravelmente estável durante muitos anos (como demonstrado a partir de uma coorte considerável de tecido cerebral de pacientes com 1 - 27 anos de diagnóstico da DP) (KORDOWER, JEFFREY H. et al., 2013).

Coletivamente, esses achados indicam que as alterações fenotípicas no sistema nigroestriatal são maiores que as mudanças estruturais. Isso pode estar relacionado à degeneração dos terminais de DA, com possibilidade dos neurônios na SN encontrarem-se disfuncionais, mas ainda potencialmente viáveis. A perda de um fenótipo dopaminérgico é bem descrita em primatas, uma vez que tal perda de marcadores fenotípicos pode ocorrer tanto em função do envelhecimento normal, quanto na DP (BARTUS, RAYMOND T. et al., 2011). Além disso, quando o cérebro responde a uma lesão ou doença, é sabido que além dos mecanismos elementares e particulares à condição, se faz presente a remodelação sináptica com indução de angiogênese, neurogênese e sinaptogênese, as quais devem ser ativados e amplificados durante um processo de plasticidade cerebral restauradora endógena, afim de maximizar a recuperação funcional (SU; RATHBONE; JIANG, 2015).

Na DP, suspeita-se que inicialmente mecanismos compensatórios sejam capazes de reforçar ou apoiar as anomalias neuroquímicas, elétricas e/ou estruturais causadas pela desdiferenciação fenotípica e pré-degenerativas, mas que a longo prazo a perda dessa regulação facilite o processo de morte celular. Assim, a partir das estratégias neurorestauradoras com NTFs, pretende-se recuperar neurônios em processo de morte, revertendo anormalidades metabólicas ou fornecendo suporte trófico frente à uma redução e/ou disfunção de sua atividade. De modo que o objetivo geral da terapia de neurorestauração na DP, trata-se de alterar o ambiente fisiopatológico para restaurar o fenótipo dopaminérgico (LANG, ANTHONY E.; ESPAY, ALBERTO J., 2018).

Assim, o efeito positivo do tratamento com as doses de 10 e 50 µg do CDNF i.n. em diversos parâmetros da função motora e não motora em animais lesionados com a 6-OHDA, sem repercussão direta sobre a neurodegeneração do estriado ou da SN, pode estar relacionada a uma recuperação funcional sem modificação estrutural primária. Especula-se que mecanismos subjacentes possam estar ocorrendo no processo de neurorestauração. Não descartando ainda, a possibilidade de que outros marcadores poderiam melhor representar as modificações comportamentais à nível de SNC, além da TH; ou, até mesmo, a mediação de efeito através de outras estruturas neuroanatômicas. Fenômenos semelhantes são evidenciados desde a fase pré-clínica até os ensaios clínicos com NTFs. A citar, Huotarinen e colaboradores (2018), demonstraram que apesar dos efeitos benéficos do tratamento intranigral com o CDNF na dose

de 10 µg ou GDNF na dose de 100 µg vistos no teste de rotação com anfetamina, não repercutiram em aumento da imunomarcagem para TH no estriado ou SN de animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, 12 semanas após a administração dos NTFs (HUOTARINEN, A. et al., 2018). Nosso trabalho, corrobora com tais dados e reforça-os a partir de uma ampla análise comportamental. Portanto, para a próxima etapa do presente trabalho, de avaliação dos efeitos da administração i.n. crônica do CDNF, decidiu-se utilizar a menor dose efetiva no protocolo de avaliação a longo prazo em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB.

Desta forma, o protocolo de tratamento crônico com o CDNF i.n., consistiu na administração diária de CDNF i.n. na dose de 10 µg após, durante 15 dias. Essa avaliação foi feita sob as mesmas condições de lesão e intervenção com o NTF pré-estabelecidas no protocolo de avaliação do efeito do CDNF i.n. a longo prazo. Ou seja, o CDNF i.n. (10 µg) foi administrado após 4 semanas da lesão com a 6-OHDA (24 µg) no MFB. Em um primeiro momento foram verificados os níveis estriatais do CDNF estriatal dos ratos frente a administração em dose única ou doses múltiplas do CDNF i.n., após 3 dias (dose única) ou 15 dias (dose única e doses múltiplas). Constatou-se que os níveis de CDNF do rato não são alterados após 3 dias de uma única dose do CDNF i.n. em relação aos animais lesionados e não tratados com o CDNF i.n. Diferentemente dos resultados obtidos após 15 dias do tratamento em dose única ou múltiplas, onde neste tempo ambas as abordagens aumentaram significativamente e em proporção semelhante os níveis do CDNF do rato.

Tais resultados corroboram com o trabalho de Nadella e colaboradores (2014), que demonstraram que a partir da transfecção do gene humano do CDNF (CDNFh), houve um aumento tanto na expressão de transcritos do CDNF do rato (CDNFr), quanto nos níveis proteicos da proteína do rato. Essas constatações demonstram, inclusive, que esse aumento ocorreu no mesmo período pós-administração do NTF ao encontrado no presente trabalho com a administração i.n. do CDNF na forma de proteína recombinante humana (CDNFrh). Demonstraram ainda, que ao passo que se tem o aumento da expressão e níveis do CDNFr, tem-se a redução da expressão e níveis do CDNFh, chegando a ausência de seus transcritos aos 7 dias, e alta redução de seus níveis proteicos aos 15 dias – quando se evidenciou o aumento na expressão e níveis do CDNFr. Juntos, esses resultados demonstram que o CDNFh leva ao aumento do CDNFr cerca de duas semanas após sua administração, embora os mecanismos por trás dessa modulação positiva são ainda desconhecidos (NADELLA et al., 2014b). Em especial para o presente trabalho, também se demonstrou que no tempo avaliado não foram encontradas diferenças nos níveis do CDNFr frente ao tratamento com dose única ou doses múltiplas, apesar

de ambas levarem a essa modulação positiva não houve um aumento superior com a administração i.n. crônica do CDNF. Avaliações adicionais verificando os níveis de CDNF, em tempos superiores a 15 dias e outras regiões encefálicas seriam interessantes para certificar se esse padrão se mantém. Até porque, quando avaliado o efeito da administração i.n. de uma única dose ou doses múltiplas do CDNF sobre a função motora dos animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, pôde-se verificar diferenças substanciais no desempenho motor dos animais tratados cronicamente com o CDNF i.n.

O tratamento crônico com o CDNF i.n. levou a uma reversão total do prejuízo causado pela lesão com a 6-OHDA no teste do rotarod e no teste do cilindro; distinguindo-se dos animais que receberam apenas uma dose do CDNF i.n., onde 15 dias após o tratamento ainda não apresentavam melhoras na coordenação, equilíbrio e assimetria de membros causadas pela lesão com a 6-OHDA. Ademais, o teste de rotação com a apomorfina, como um indicativo do nível de lesão dopaminérgica permite inferirmos, que 15 dias após o tratamento em doses múltiplas diárias do CDNF i.n. na dose de 10 µg, possivelmente tem-se uma redução na neurodegeneração causada pela 6-OHDA. Pois singularmente, o grupo tratado cronicamente com o CDNF i.n. foi o único, que além de não aumentar o número de rotações contralaterais à lesão no teste, ainda levou a uma redução significativa no número de rotações induzidas pela apomorfina após 15 dias de tratamento. Diante desses achados, atesta-se a superioridade de benefícios da administração crônica do CDNF i.n., em relação à administração em dose única do CDNF i.n., ainda que não tenham sido constatados níveis de CDNF_r estriatais distintos após o tratamento com ambos. Neste caso, o efeito funcional e, possivelmente, à nível de neurorestauração, levam-nos à tal inferência sobre a potencialidade da administração crônica do CDNF i.n. em um modelo da DP avançado.

A maioria dos NTFs tem meia-vida curta *in vivo* e perfis farmacocinéticos com limitada distribuição. Além da BHE, o acesso ao SNC é restrito pela rápida inativação enzimática, múltiplos processos de eliminação, potencial imunogenicidade e sequestro por ligação de proteínas e outros componentes do sangue e tecidos periféricos (THORNE; FREY, 2001). Em um estudo farmacocinético de dose única em ratos saudáveis, o CDNF_{rh} foi infundido bilateralmente no estriado de ratos. O perfil farmacocinético demonstrou que o CDNF_{rh} se difunde rápida e amplamente, e é eliminado com a meia-vida tecidual no estriado em 5,5h e na SN após cerca de 9h. O CDNF_{rh} demonstrou ser internalizado de maneira inespecífica e generalizada por neurônios corticais e estriatais, exibindo diferentes padrões de distribuição subcelular do CDNF_{rh}, entre 2 e 6h após sua administração; localizando-se no

interior de endossomos e corpos multivesiculares. Além disso, após infusão intraestriatal, o CDNFrh é transportado à SN, e encontrado quase que exclusivamente em neurônios TH⁺. Assim, apesar do tempo de meia-vida relativamente curto, o CDNFrh possui boa biodisponibilidade e biodistribuição após infusão intraparenquimal (MÄTLIK et al., 2017). De forma que, o CDNF apresenta boa parte dos seus estudos pré-clínicos e seu estudo clínico, mediados a partir da infusão da proteína recombinante humana – CDNFrh (HUTTUNEN; SAARMA, 2019). Assim como demonstrado no presente estudo, uma única administração do NTF é capaz de trazer benefícios potenciais e prolongados. Todavia, a exemplo do GDNF e da NRTN, a liberação na forma de vetores dos NTFs tem ganho destaque nas pesquisas, objetivando-se aumentar o tempo de ação e a quantidade do NTF liberado. Para o CDNF, atualmente, 50% dos estudos em modelos animais da DP tem demonstrado seus efeitos positivos através da abordagem de superexpressão do NTF através da terapia gênica (BÄCK et al., 2013; CORDERO-LLANA, O. et al., 2015; JIAMING, MEI; NIU, CHAOSHI, 2015; MEI, J.; NIU, 2015a; NADELLA et al., 2014b; REN, X. et al., 2013; WANG, L. et al., 2017).

Em relação ao tratamento crônico, além do presente trabalho, apenas um estudo avaliou o efeito da proteína CDNFrh na forma não vetorial. Nesse estudo, Voutilainen e colaboradores (2011), utilizaram um sistema de bomba osmótica com canulação intraestriatal para infusão diária e contínua do CDNF, GDNF e MANF (todos na forma da proteína recombinante humana), 2 semanas após a indução da lesão unilateral com a 6-OHDA (2 × 10 µg) no estriado. Dos NTFs avaliados, somente o CDNF apresentou benefícios no tratamento crônico, utilizando a dose de 1.5, 3 ou 4.5 µg/dia, durante 14 dias. O efeito do tratamento crônico foi demonstrado no teste de rotação com anfetamina de maneira cumulativa até 12 semanas após o início da terapia com o CDNFrh (na dose de 3 µg/dia). Bem como na imunomarcagem para TH, na SNc (com níveis médios de redução da TH de 75% nos animais 6-OHDA para cerca de 40%, frente o tratamento com o CDNFrh nas doses de 3 e 4.5 µg/dia) e no estriado (com níveis médios de redução da TH de 35% nos animais 6-OHDA para cerca de 25%, frente o tratamento com o CDNFrh nas doses de 1.5, 3 e 4.5 µg/dia), 12 semanas após o início da terapia. Assim, o tratamento crônico com o CDNF apresentou benefícios superiores ao GDNF e MANF no modelo de lesão parcial da DP. Em especial, Voutilainen e colaboradores (2011), acrescentam informações a respeito da segurança do tratamento crônico, diante da infusão diária do CDNFrh durante 2 semanas e acompanhamento mantido por até 12 semanas. Como demonstrado, o tratamento crônico foi bem tolerado e sem nenhum sinal de toxicidade no decorrer desse período (VOUTILAINEN, M. H. et al., 2011). Os resultados da administração

crônica do CDNF_{rh} através da bomba osmótica para infusão contínua, corroboram e reforçam a validade dos achados encontrados no presente trabalho com a administração em doses múltiplas diárias do CDNF_{rh} por via i.n., durante 15 dias, em um modelo de lesão total da DP.

Visto o efeito da administração crônica i.n. do CDNF em animais lesionados com a 6-OHDA no MFB, o próximo passo do presente estudo tratou de investigar a relação do tratamento crônico com a L-DOPA sobre os níveis de NTFs; bem como, o efeito da associação terapêutica crônica do CDNF i.n. com a L-DOPA v.o. Desde a década de 1960, a L-DOPA é o fármaco mais utilizado para o tratamento da DP. Sua introdução na terapia da DP modificou severamente os escores de mortalidade e morbidade apresentados pelos pacientes parkinsonianos, aumentando consideravelmente a qualidade de vida, em especial pelo controle da sintomatologia motora. Até os dias atuais, a L-DOPA permanece como tratamento padrão-ouro na DP (OLANOW, 2015).

A eficácia da L-DOPA depende de fatores periféricos, como a absorção gastrointestinal, distribuição plasmática, passagem pela BHE e à nível central, sua conversão neuronal em DA pela DDC em neurônios pré-sinápticos dopaminérgicos. Todos esses componentes envolvidos no tratamento por v.o. com a L-DOPA, têm influência considerável sobre a meia-vida plasmática curta da droga, que dura aproximadamente 1 h (CONTIN; MARTINELLI, 2010). Tal perfil farmacocinético periférico e central, é traduzido em um estímulo não fisiológico “pulsátil” dos receptores de DA pós-sinápticos. Esse padrão gera a disfunção de genes e receptores, alterando a atividade neuronal e contribuindo para o desequilíbrio de outros sistemas de neurotransmissão, como o glutamatérgico e o serotoninérgico (MÜLLER; MÖHR, 2019).

Até certo ponto, os neurônios dopaminérgicos estriatais pré-sinápticos ainda podem compensar essas flutuações dos níveis de L-DOPA e DA, especialmente por meio de autoreceptores pré-sinápticos, que regulam a síntese pré-sináptica e a liberação da DA na fenda sináptica. No entanto, a progressão da DP com perda emergente de neurônios dopaminérgicos pré-sinápticos reduz essa capacidade compensatória existente. De modo que, a síntese pré-sináptica, armazenamento e regulação da liberação de DA para a ativação do receptor pós-sináptico, dependem cada vez mais da reposição dopaminérgica exógena. Por vez, a L-DOPA em si, também apresentará elevada conversão em DA por neurônios serotoninérgicos, que são controlados por autoreceptores sensíveis à DA e, em última instância, levam a maior sensibilidade dos receptores pós-sinápticos dopaminérgicos. Assim, é bem reconhecido que com a progressão da doença, avanço da neurodegeneração e a necessidade do aumento das

doses da L-DOPA, culminam com importantes efeitos adversos, como flutuações motoras, encurtamento do tempo de ação da droga, e as discinesias induzidas pela L-DOPA – LIDs (THANVI; LO, 2004).

As LIDs representam a principal complicação da farmacoterapia da DP. A perda neurônios dopaminérgicos nigrais induz anormalidades na conectividade entre o córtex motor e o estriado. De forma que, as LIDs têm sido atribuídas a um desequilíbrio entre as vias de promoção e supressão do movimento nos gânglios basais, favorecendo a via direta através da ativação de receptores D1 para DA e reduzindo a ativação da via indireta através de receptores D2 de DA (FABBRINI et al., 2007). Sobretudo, diversos mecanismos moleculares subjacentes parecem influenciar para essa resposta final regida pelos gânglios basais no controle do movimento. Enquanto a utilização da L-DOPA de forma aguda ativa vias de sinalização intracelular, respostas transcricionais e sinápticas em neurônios dopaminérgicos; a exposição contínua a L-DOPA causa adaptações moleculares e estruturais persistentes envolvendo tanto neurônios quanto células não neuronais (CENCI, M. ANGELA; OHLIN; RYLANDER, 2009). Além disso, já foi demonstrado que o tratamento agudo e crônico com a L-DOPA, modulam um conjunto comum de genes envolvidos na transcrição, tradução, exocitose e transdução de sinais. No entanto, um número cerca de três vezes maior de genes é alterado após o tratamento crônico com a L-DOPA em comparação ao agudo e muitos genes envolvidos no crescimento de projeções neuronais, sinaptogênese e proliferação celular foram especificamente alterados nos animais tratados cronicamente com a L-DOPA (EL ATIFI-BOREL et al., 2009). De modo geral, boa parte desses processos de plasticidade associados aos efeitos do tratamento crônico com a L-DOPA, está envolvido também nas atividades moduladas por NTFs. Além disso, não se descarta a possibilidade de atuação direta dos NTFs sobre a regulação da produção, liberação e metabolismo de DA no estriado, melhorando assim o processamento da execução motora (SULLIVAN; TOULOUSE, 2011).

Neste seguimento, a associação da L-DOPA à terapia com NTFs poderia não somente ser uma opção de modificar o curso natural da DP, como também exercer um efeito sinérgico sobre a sintomatologia da DP e/ou atuar sobre os mecanismos envolvidos com o surgimento dos efeitos adversos advindos do tratamento crônico com a L-DOPA. De fato, evidências dos ensaios clínicos com NTFs em pacientes com a DP, apoiam essa hipótese. Já no primeiro ensaio clínico com resultados positivos do GDNF, demonstrou-se que além de um efeito positivo da terapia com o NTF sobre a escala de avaliação motora da UPDRS, houve também uma mudança significativa nos escores de gravidade das LIDs, com redução de mais de 60% durante a fase

on e a ausência de quaisquer AIMS na fase *off* da medicação (GILL, STEVEN S. et al., 2003). De forma semelhante, anos após utilizando-se o vetor para superexpressão da NRTN, constatou-se um aumento de 2-3h no tempo sem LIDs durante a fase *on* (MARKS, W. J. et al., 2008). E mais recentemente, Whone e colaboradores, demonstraram diferenças, inclusive, na dose equivalente de L-DOPA utilizada pelos pacientes. A dose de L-DOPA necessária para o controle adequado da sintomatologia motora foi significativamente menor 20 meses após o início do tratamento com o GDNF, do que após os 10 primeiros meses iniciais. Assim como, os pacientes tratados desde o início do ensaio clínico com o GDNF, atingiram os 20 meses de tratamento com o uso de uma menor dose de L-DOPA do que aqueles que começaram a receber o tratamento com o GDNF a partir da metade do protocolo clínico (a dose média diária de L-DOPA aumentou 36 ± 186 mg desde a linha de base no grupo GDNF/GDNF em comparação com 160 ± 230 mg no grupo placebo/GDNF) (WHONE, ALAN L. et al., 2019). Esses resultados indicam um possível efeito sinérgico e antidiscinético da associação entre L-DOPA e GDNF ou NRTN em pacientes com a DP.

Em modelos animais da DP essa condição tem sido muito pouco explorada. Apesar de se antever que em ensaios clínicos os pacientes darão continuidade a terapia padrão com a L-DOPA e que muitos deles, provavelmente, já apresentarão as LIDs; poucos trabalhos pré-clínicos avaliam o efeito da associação da L-DOPA com os NTFs. Um desses poucos trabalhos foi desenvolvido por Iravani e colaboradores no ano de 2001. De maneira inédita, foi demonstrado que uma única administração unilateral do GDNF unilateralmente, foi capaz de atenuar as LIDs em modelo da DP induzido pelo MPTP em primatas não-humanos. Quando pré-administrado em relação a L-DOPA (12,5 mg/kg), o GDNF (100 µg) levou a uma melhora na incapacidade motora após duas semanas, enquanto os escores de LIDs foram reduzidos a partir da quarta semana. Dado o *priming* de L-DOPA os animais receberam uma segunda injeção de GDNF (100 µg), o efeito sobre os déficits motores foi mantido, enquanto os escores de LIDs foram reduzidos somente a partir da quarta semana. Assim, além do GDNF promover a recuperação de neurônios TH⁺ na SN e no estriado, foi capaz de gerar um modesto efeito antidiscinético em primatas não-humanos lesionados com o MPTP (IRAVANI et al., 2001). Além dessa, outras duas evidências em modelos animais suportam o envolvimento entre as LIDs e os NTFs.

Atualmente a amantadina trata-se do único fármaco com eficácia antidiscinética comprovada sendo amplamente utilizada na prática clínica diária. Como um antagonista dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA e o envolvimento direto desse sistema de

neurotransmissão no desenvolvimento das LIDs, o mecanismo de ação da amantadina para redução das LIDs foi primeiramente relacionado a essa propriedade. Todavia, há controvérsias em relação ao seu verdadeiro modo de ação. Um estudo realizado por Ossola e colaboradores (2011), indicou que a ação da amantadina sobre o receptor NMDA não é crucial para o seu efeito antidiscinético e neuroprotetor. Em vez disso, os mecanismos propostos têm relação, dentre outros, ao aumento nos níveis de GDNF induzidos pelo tratamento com a amantadina (OSSOLA et al., 2011).

Por fim, um trabalho recente do grupo, realizado por Speck e colaboradores (2019), forneceu evidências de que o exercício físico, também considerado um agente modificador do curso da DP, levou à redução dos escores de discinesias induzidas pela L-DOPA (50 mg/kg) em camundongos lesionados unilateralmente com a 6-OHDA (10 µg) no estriado. Sobretudo, propõe-se que o exercício físico controlado em esteira atenuou as LIDs, pelo menos em parte, a partir da modulação dos níveis estriatais do GDNF, como visualizado pelo aumento desse NTF no grupo exercitado versus o grupo sedentário (SPECK et al., 2019).

Em culturas celulares, por outro lado, é sabido que a DA e a L-DOPA possuem potencial citotóxico em determinadas condições de meio e concentração. O mecanismo subjacente à toxicidade celular tem relação com o dano oxidativo dos produtos de degradação das catecolaminas, incluindo derivados de quinona e radicais livres de processos de auto-oxidação e formação de conjugados de cisteína, os quais são potencialmente citotóxicos (CHENG et al., 1996). Neste contexto, Fonseca e colaboradores (2014), demonstraram que a toxicidade mediada pela L-DOPA (100 – 400 µM) em coculturas de neurônios estriatais e células gliais, induziu a liberação de mediadores solúveis que promovem a expressão e aumento dos níveis do GDNF (FONSECA et al., 2014). Assim também, a exposição de culturas com toxicidade mediada pela L-DOPA à diferentes NTFs, como NGF, GDNF, BDNF e o bFGF, levou ao aumento da viabilidade celular (MENA et al., 1998). Esses trabalhos demonstram que determinados NTFs podem exercer um papel restaurador específico no processo de auto-oxidação da L-DOPA; o qual, *in vivo*, pode ocorrer quando a L-DOPA encontra-se em excesso na fenda sináptica após sua liberação pulsátil como evidenciado nas LIDs.

Em um contexto não citotóxico, a L-DOPA potencializou a resposta do NGF em culturas celulares. Visto a partir de neuritos tratados com a associação, os quais exibiram tamanho e frequência de liberação de DA duas vezes maior do que as culturas incubadas apenas com o NGF. Tais resultados demonstram o potencial sinérgico da associação, sobre respostas

morfológicas e fisiológicas, fornecendo uma base para a potenciação pré-sináptica a longo prazo da L-DOPA e ações terapêuticas (MENA et al., 1998).

Diante de todas essas evidências de ensaios clínicos em humanos e ensaios pré-clínicos em primatas não-humanos, roedores e até mesmo em culturas celulares, a próxima etapa do presente trabalho tratou de avaliar o potencial do CDNF sobre as LIDs. Para isso, primeiramente validou-se o protocolo de indução das LIDs nos animais lesionados com a 6-OHDA (24 µg) injetada unilateralmente no MFB. Após 4 semanas da indução da lesão os animais foram tratados durante 15 dias com a L-DOPA (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida, 1 vez ao dia, v.o.) e durante esse período constatou-se o desenvolvimento das LIDs, observadas durante os dias 1, 4, 7 e 14 após início do tratamento. Além disso, verificou-se que o tratamento com a L-DOPA melhorou a capacidade motora dos animais no teste do cilindro e que a lesão com a 6-OHDA levou a redução de cerca de 95% no imunocontéudo de TH estriatal e indução de rotações contralaterais à lesão no teste de rotação com apomorfina.

Neste momento, contudo, o resultado mais interessante diz respeito a quantificação dos níveis estriatais do CDNF e do GDNF, realizada ao final do protocolo. Afinal, o tratamento crônico com a L-DOPA levou não somente ao surgimento das LIDs, como também a uma redução significativa no imunocontéudo de ambos os NTFs avaliados. A redução no conteúdo do CDNF e do GDNF frente ao tratamento crônico com a L-DOPA ocorreu de forma independente à lesão, indicando uma importante modulação nos níveis de NTFs mediante o tratamento a longo prazo com altas doses de L-DOPA. Esses resultados iniciais, fornecem ainda mais indícios sobre o potencial efeito positivo da associação do CDNF a L-DOPA. Muito embora, em uma avaliação adicional realizada a partir de um conjunto de dados de amostras do estriado e da SN de animais discinéticos e não discinéticos, não tenham sido evidenciadas diferenças significativas nos níveis de transcritos de distintos NTFs (CDNF, GDNF, BDNF e NGF).

Da mesma forma que no protocolo de administração i.n. crônica do CDNF, utilizou-se a menor dose efetiva (10 µg) para a associação com a L-DOPA v.o. (12,5 mg/kg + 3,125 mg/kg de benserazida). O tratamento diário com o CDNF i.n. precedeu 30min a administração da L-DOPA, durante 15 dias e iniciou 4 semanas após a indução da lesão com a 6-OHDA no MFB. A avaliação da função motora dos animais, demonstrou um efeito sinérgico da associação sobre a assimetria motora dos animais, avaliada no teste do cilindro. Onde o desempenho dos animais tratados com o CDNF i.n. juntamente a L-DOPA v.o., aumentou cerca de 40% o uso da pata contralateral à lesão 15 dias após o tratamento com a associação farmacológica, em

relação ao período antecedente ao tratamento. Enquanto a melhora observada nos animais tratados apenas com L-DOPA v.o. foi significativamente menor, cerca de 10%. Esse mesmo perfil de resposta não foi reproduzido no teste do rotarod, onde ambos os grupos experimentais apresentaram uma melhora semelhante após o tratamento crônico. Sobretudo, esses resultados demonstram de maneira inédita o efeito sinérgico do tratamento com o CDNF e a L-DOPA.

Indiretamente observou-se um desfecho semelhante a partir da associação entre o AAV8-CDNF ($2,8 \times 10^{13}$ v.g.) e o AAV8-DDC ($2,2 \times 10^{13}$ v.g.), respectivamente, o vetor viral para superexpressão do CDNF e da enzima conversora da L-DOPA em DA. O tratamento combinado com ambos os vetores foi realizado 5 semanas após a lesão com a 6-OHDA (4 µg) no MFB. A partir do qual comparou-se o efeito do tratamento com cada um dos vetores ou da associação dos vetores CDNF/DDC, o qual foi significativamente superior em vários parâmetros. No teste de rotação com a anfetamina, o tratamento com associação reduziu o número de rotações ipsilaterais à lesão em proporção significativamente maior que o tratamento com os vetores isoladamente, por até 11 semanas após a administração dos vetores. Apesar da imunomarcagem para TH no estriado e na SN ter sido semelhante entre o AAV8-CDNF e associação AAV8-CDNF/DDC, o aumento nos níveis estriatais de DA ocorreram exclusivamente mediante o tratamento com a associação AAV8-CDNF/DDC, 12 semanas após a administração dos vetores (WANG, L. et al., 2017). Portanto, juntamente com o estudo de Wang e colaboradores (2017), o presente trabalho demonstra ser potencialmente benéfica a associação dos tratamentos, CDNF e L-DOPA. A administração crônica por via i.n. nesse cenário, vem para engrandecer ainda mais essas evidências do efeito neurorestaurador combinado.

Diante desse conjunto de resultados, finalmente testou-se o efeito do CDNF i.n. sobre as LIDs. Todavia, apesar das inúmeras evidências positivas, o tratamento com o CDNF i.n. não modificou a expressão das LIDs, como visualizado pelos escores de AIMS, 7 e 14 dias após o tratamento crônico do NTF junto à L-DOPA. Assim também, a análise individual de cada um dos dias ou dos parâmetros de AIMS avaliados, não demonstra quaisquer diferenças entre os grupos. Ao final do protocolo, o tecido estriatal dos animais demonstrou que o tratamento associado levou ao aumento nos níveis do CDNF_r, 15 dias após o início da terapia com o CDNF i.n. combinado à L-DOPA. Uma análise de correlação, revelou que os animais tratados com a associação (CDNF+L-DOPA), apresentaram uma relação negativa entre a severidade das LIDs e os níveis estriatais do CDNF_r. Ou seja, quanto maior os níveis do CDNF_r, menor foram os escores de LIDs. Contudo, apesar deste resultado de correlação estar de acordo com nossa

hipótese inicial, de que um aumento nos níveis do CDNF endógenos, resultaria em redução das LIDs. De forma bastante intrigante, os animais que receberam a monoterapia com a L-DOPA apresentaram uma correlação moderada contrária à do tratamento com o CDNF combinado. Ou seja, quanto maior o nível do CDNF, mais alto foram os escores de LIDs. De qualquer forma, estes resultados de correlação indicam ainda um possível envolvimento entre essas duas variáveis: níveis do CDNF e severidade das LIDs, muito embora, o CDNF i.n. não tenha demonstrado efeito antidiscinético nas condições testadas.

A ausência de efeitos do CDNF sobre o desenvolvimento das discinesias, foi demonstrado também, no único trabalho presente na literatura atualmente que relacionou a terapia com o CDNF a um possível efeito antidiscinético. Huotarinen e colaboradores (2018), utilizaram o protocolo de discinesias associada à estimulação de alta frequência no núcleo subtalâmico (STN-HFS). A STN-HFS reduz os sintomas motores parkinsonianos e indiretamente melhora a discinesia ao diminuir a necessidade de L-DOPA. No entanto, a estimulação inadequada também pode desencadear movimentos discinéticos em pacientes com DP e modelos animais, gerando discinesias semelhantes às induzidas pela L-DOPA. A dose do CDNF utilizada neste trabalho foi a mesma que utilizamos do CDNF i.n., 10 µg; com a diferença de administração intraestriatal. Quanto à lesão dopaminérgica, da mesma forma, injetou-se unilateralmente a 6-OHDA no MFB, contudo em menor dose do que a utilizada no presente trabalho (10 µg vs. 24 µg). Infelizmente, o desfecho observado nos dois trabalhos foi o mesmo, ambos não observaram um efeito antidiscinético associado ao tratamento com o CDNF, durante as 8 semanas de avaliação (HUOTARINEN, A. et al., 2018).

Por ora, concluímos que estudos adicionais são necessários para certificar-se do exato papel do CDNF sobre as LIDs. Em contrapartida, a combinação do tratamento crônico do CDNF i.n. a L-DOPA v.o., apresentou resultados positivos sobre a função motora, sustentando a estratégia de associação terapêutica com fins paliativos e curativos, ainda que não seja comprovado potencial antidiscinético do CDNF.

Além de observar a modulação exercida pela L-DOPA sobre os níveis de NTFs, o principal objetivo nesse sentido, tratou-se de investigar se o envelhecimento, bem como, a lesão dopaminérgica em modelos ou pacientes com a DP, alteraria os níveis de NTFs. Nesse sentido, diversas outras pesquisas têm sido feitas investigando esse mesmo tópico.

Afinal, as doenças neurodegenerativas compartilham um fator predisponente comum, o envelhecimento do cérebro. O envelhecimento é um processo fisiológico acompanhado da desregulação de processos celulares e sinápticos, além da redução natural de determinadas

populações neuronais. Uma questão importante é como o envelhecimento normal do cérebro transita para o envelhecimento patológico, dando origem a doenças neurodegenerativas (YANKNER; LU; LOERCH, 2008). Assim, uma questão em pauta, é se os NTFs poderiam estar envolvidos nesse processo de transição do fisiológico para o patológico, dado suas propriedades celulares. Além da gama de evidências que suportam que um aumento nos níveis dos NTFs no SNC tem potencial protetor em diversos modelos e doenças (DIOGO et al., 2017).

Contudo, os trabalhos que avaliaram os níveis e expressão de diferentes NTFs, frente ao envelhecimento per se ou associado a modelos animais e pacientes com a DP, apresentam resultados bastante conflitantes. Trata-se de pelo menos uma dezena de trabalhos, ora demonstrando aumento de determinado NTF, em determinada região cerebral, sob determinado grau de degeneração dopaminérgica e estágio da DP. Por exemplo, as evidências derivadas de estudos *post-mortem* demonstram níveis ou expressão reduzidos do BDNF (CHAUHAN; SIEGEL; LEE, 2001; MOGI et al., 1999), NGF (MOGI et al., 1999), GDNF (CHAUHAN et al., 2001) e CNTF (CHAUHAN et al., 2001) na SN de pacientes idosos com DP. Bem como, níveis circulantes de NGF (LORIGADOS PEDRE et al., 2002) e BDNF (SCALZO et al., 2010; WANG, Y. et al., 2017) também foram encontrados alterados na circulação de pacientes com DP. Enquanto, o mais recente trabalho analisando os níveis de BDNF, NGF, NT-3, NT-4 e GDNF, não encontrou quaisquer modificações nos níveis de todos esses NTFs em pacientes com DP (ROCHA et al., 2018). Além de uma enormidade de evidências em roedores, onde os resultados mais frequentes referem-se à redução do GDNF e BDNF no cérebro idoso (CALABRESE et al., 2013; CONNOR et al., 1999; KATOH-SEMBA et al., 1998; YUREK; FLETCHER-TURNER, 2001).

O presente trabalho acrescenta informações nesse seguimento, a quantificação dos níveis proteicos do GDNF em animais jovens (3-4 meses de idade) e idosos (20-22 meses de idade), SHAM ou lesionados com a 6-OHDA (24 µg) no MFB, demonstraram uma redução significativa do GDNF estriatal em relação à lesão com a 6-OHDA e uma redução ainda maior em relação ao envelhecimento dos animais. Entretanto, na SN não foram encontradas diferenças significativas na análise dos níveis de GDNF pela técnica de Western Blotting. Inclusive, em uma análise do perfil de expressão diferencial de animais lesionados com a 6-OHDA, mostrou-se um aumento transitório de GDNF 4 semanas após a lesão, cerca de 14%. Em pacientes com a DP, a análise da expressão de transcritos a partir de um conjunto de dados obtidos da literatura, demonstrou uma redução significativa e transitória, em pequena proporção (apenas 9%) na SN de pacientes com a DP moderada (Braak = 3 – 4). De forma que para o GDNF, as maiores

diferenças encontradas foram à nível estriatal, com redução de seus níveis em decorrência do envelhecimento e da lesão dopaminérgica com a 6-OHDA no MFB.

O BDNF foi analisado em dois conjuntos de dados a partir do perfil de expressão diferencial de seus transcritos. Em roedores lesionados com a 6-OHDA, foi encontrado uma redução transitória de cerca de 23 e 33% na expressão dos transcritos do BDNF, respectivamente 2 e 4 semanas após a lesão. Todavia, um dos resultados mais expressivos durante a análise dos níveis de NTFs, diz respeito a redução pronunciada do BDNF na SN de pacientes com a DP. Os níveis de transcritos de BDNF foram encontrados reduzidos em 72, 57 e 107% nos pacientes com DP leve, moderada e avançada, respectivamente. O NGF por vez, analisado em ambos os conjuntos de dados, não apresentou diferenças significativas no nível de seus transcritos em roedores ou pacientes com a DP. Em linhas gerais, os resultados obtidos no presente estudo, com o GDNF (à nível estriatal) e o BDNF (à nível nigral), corroboram com dados da literatura que indicam sua redução em modelos animais e pacientes com a DP.

Sobretudo, de maneira pioneira, demonstramos o efeito do envelhecimento e de um modelo da DP avançada sobre os níveis do CDNF. Em relação ao fator idade, foi evidenciada uma redução significativa nos níveis estriatais do CDNF de ratos idosos (20-22 meses) quando comparado a animais jovens SHAM. Este perfil não foi evidenciado em decorrência da lesão com a 6-OHDA (24 µg) no MFB, indicando que o modelo de lesão da DP avançada não pareceu ter influência sobre os níveis estriatais do CDNF. Portanto, a atividade benéfica evidenciada com a administração i.n. do CDNF, avaliada nos mais diversos aspectos no presente estudo, não parece ser em decorrência da reposição de um suprimento trófico limitado do CDNF.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho constituem uma base de referências sólidas que demonstram, de maneira inédita: o efeito positivo do CDNF i.n. sobre sintomas motores e não motores, com restauração parcial dos neurônios da SNc dorsal após 8 meses da administração i.n. do NTF; o efeito positivo do tratamento crônico com uma dose subefetiva do CDNF i.n. sobre parâmetros da função motora e níveis estriatais do NTF; o efeito positivo do tratamento crônico com o CDNF i.n. associado à L-DOPA v.o. sobre parâmetros da função motora e níveis estriatais do NTF; além da inferência que a atividade do CDNF i.n. possa estar relacionada a modulação da atividade do NTF e/ou do microambiente neuronal afetado pelos mecanismos elementares da DP e não, necessariamente, em decorrência de um suprimento trófico limitado do CDNF. Todos esses achados a partir de uma abordagem neurorestauradora, em um modelo que simula o estágio avançado da DP e com administração do NTF por uma via não-invasiva.

8 CONCLUSÕES

É evidente o crescente interesse em explorar o uso da via de administração i.n. no tratamento de doenças neurológicas, como a DP. A conjuntura à qual foi testado o CDNF por via i.n. torna ainda mais relevante os efeitos observados com o método de entrega do NTF. Seu potencial em reverter prejuízos motores, cognitivos e de emocionalidade em um modelo que se relaciona às fases avançadas da DP, sobressai-se às várias das estratégias até então utilizadas na pesquisa com o CDNF. Ainda mais, considerando um efeito neurorestaurador do CDNF i.n. até 8 meses após sua administração. Além disso, no presente estudo foram apresentados indícios de que a L-DOPA, administrada cronicamente, pode modular os níveis do CDNF – achado este, que abre portas para futuras investigações. A citar, a abordagem de associação de ambas as drogas, como uma alternativa com propriedades curativas e não somente paliativas, obtida através do efeito sinérgico do CDNF i.n. a L-DOPA. Atesta-se, por fim, que o presente trabalho fornece uma prova de conceito quanto a utilização da via de administração i.n. para o CDNF – como reflexo de uma estratégia de entrega segura e eficaz; sendo capaz de oferecer benefícios em um modelo da DP avançada. Esses achados trazem consigo a bagagem de um campo repleto de perspectivas positivas para o futuro das terapias baseadas em NTFs na DP.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, A. S. et al. Physical exercise improves motor and short-term social memory deficits in reserpinized rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, n. 6, p. 452-457, 2009/08/14/ 2009.
- AHLISKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Mov Disord**, v. 16, n. 3, p. 448-58, May 2001.
- AIRAKSINEN, M. S.; SAARMA, M. The GDNF family: Signalling, biological functions and therapeutic value. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 5, p. 383-394, 2002/05/01 2002.
- AIRAVAARA, M. et al. CDNF protects the nigrostriatal dopamine system and promotes recovery after MPTP treatment in mice. **Cell Transplant**, v. 21, n. 6, p. 1213-23, 2012.
- ALY, A. E.-E. et al. Intranasal Delivery of pGDNF DNA Nanoparticles Provides Neuroprotection in the Rat 6-Hydroxydopamine Model of Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 1, p. 688-701, January 01 2019.
- ALY, A. E.; WASZCZAK, B. L. Intranasal gene delivery for treating Parkinson's disease: overcoming the blood-brain barrier. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 12, n. 12, p. 1923-41, 2015.
- ALY, A. E. E.; WASZCZAK, B. L. Intranasal gene delivery for treating Parkinson's disease: overcoming the blood-brain barrier. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 12, n. 12, p. 1923-1941, 2015/12/02 2015.
- ARON, L.; KLEIN, R. Repairing the parkinsonian brain with neurotrophic factors. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 2, p. 88-100, Feb 2011.
- AU - DEACON, R. M. J. Measuring Motor Coordination in Mice. **JoVE**, n. 75, p. e2609, 2013/05/29/ 2013.
- BACK, S. et al. Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease. **Brain Behav**, v. 3, n. 2, p. 75-88, Mar 2013.
- BÄCK, S. et al. Gene therapy with AAV2-CDNF provides functional benefits in a rat model of Parkinson's disease. **Brain and behavior**, v. 3, n. 2, p. 75-88, 2013.
- BANKS, W. A. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, p. 275, 01/22/online 2016.
- BARBOSA, M. T. et al. Parkinsonism and Parkinson's disease in the elderly: A community-based survey in Brazil (the Bambuí study). **Movement Disorders**, v. 21, n. 6, p. 800-808, 2006.
- BARTUS, R. T. et al. Advancing neurotrophic factors as treatments for age-related neurodegenerative diseases: developing and demonstrating "clinical proof-of-concept" for

AAV-neurturin (CERE-120) in Parkinson's disease. **Neurobiol Aging**, v. 34, n. 1, p. 35-61, Jan 2013.

BARTUS, R. T. et al. Safety/feasibility of targeting the substantia nigra with AAV2-neurturin in Parkinson patients. **Neurology**, v. 80, n. 18, p. 1698-701, Apr 30 2013.

BARTUS, R. T. et al. Bioactivity of AAV2-neurturin gene therapy (CERE-120): differences between Parkinson's disease and nonhuman primate brains. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 26, n. 1, p. 27-36, 2011.

BARTUS, R. T.; JOHNSON, E. M., JR. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 1: Where have we been and what have we learned? **Neurobiol Dis**, v. 97, n. Pt B, p. 156-168, Jan 2017a.

_____. Clinical tests of neurotrophic factors for human neurodegenerative diseases, part 2: Where do we stand and where must we go next? **Neurobiol Dis**, v. 97, n. Pt B, p. 169-178, Jan 2017b.

BENDER, T. S. et al. Intranasal administration of glial-derived neurotrophic factor (GDNF) rapidly and significantly increases whole-brain GDNF level in rats. **Neuroscience**, v. 303, p. 569-576, 2015/09/10/ 2015.

BLANCHARD, D. C.; GRIEBEL, G.; BLANCHARD, R. J. Mouse defensive behaviors: pharmacological and behavioral assays for anxiety and panic. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 25, n. 3, p. 205-218, 2001/05/01/ 2001.

BOUET, V. et al. The adhesive removal test: a sensitive method to assess sensorimotor deficits in mice. **Nature Protocols**, v. 4, n. 10, p. 1560-1564, 2009/10/01 2009.

BRAAK, H.; BRAAK, E. Pathoanatomy of Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 247, n. 2, p. II3-II10, April 01 2000.

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, 2004/10/01 2004.

BRAZMA, A. et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. **Nature Genetics**, v. 29, n. 4, p. 365-371, 2001/12/01 2001.

BROOKS, S. P.; DUNNETT, S. B. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, n. 7, p. 519-529, 2009/07/01 2009.

BRUNDIN, P. et al. Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 10, p. 741-745, 2008/10/01 2008.

BUITRAGO, M. M. et al. Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 81, n. 3, p. 211-216, 2004/05/01/ 2004.

CALABRESE, F. et al. Reduced neuroplasticity in aged rats: a role for the neurotrophin brain-derived neurotrophic factor. **Neurobiology of Aging**, v. 34, n. 12, p. 2768-2776, 2013/12/01/ 2013.

CALABRESI, P. et al. Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. **Nat Neurosci**, v. 17, n. 8, p. 1022-30, Aug 2014.

CARTER, R. J.; MORTON, J.; DUNNETT, S. B. Motor Coordination and Balance in Rodents. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 8.12.1-8.12.14, 2001.

CARVALHO, M. M. et al. Behavioral characterization of the 6-hydroxidopamine model of Parkinson's disease and pharmacological rescuing of non-motor deficits. **Molecular neurodegeneration**, v. 8, p. 14-14, 2013.

CENCI, M. A.; LUNDBLAD, M. Ratings of L-DOPA-Induced Dyskinesia in the Unilateral 6-OHDA Lesion Model of Parkinson's Disease in Rats and Mice. **Current Protocols in Neuroscience**, v. 41, n. 1, p. 9.25.1-9.25.23, 2007.

CENCI, M. A.; OHLIN, K. E.; RYLANDER, D. Plastic effects of L-DOPA treatment in the basal ganglia and their relevance to the development of dyskinesia. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 15, Supplement 3, p. S59-S63, 12// 2009.

CHAUHAN, N. B.; SIEGEL, G. J.; LEE, J. M. Depletion of glial cell line-derived neurotrophic factor in substantia nigra neurons of Parkinson's disease brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 21, n. 4, p. 277-288, 2001/06/01/ 2001.

CHEN, Y.-C. et al. Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor regulates multiple neuronal subtypes and behavior. **bioRxiv**, p. 733949, 2019.

CHENG, N.-N. et al. Differential neurotoxicity induced by l-DOPA and dopamine in cultured striatal neurons. **Brain Research**, v. 743, n. 1, p. 278-283, 1996/12/16/ 1996.

CHINTA, S. J.; ANDERSEN, J. K. Dopaminergic neurons. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 5, p. 942-6, May 2005.

CHOI-LUNDBERG, D. L. et al. Dopaminergic Neurons Protected from Degeneration by GDNF Gene Therapy. **Science**, v. 275, n. 5301, p. 838-841, 1997.

COHEN, S. PURIFICATION OF A NERVE-GROWTH PROMOTING PROTEIN FROM THE MOUSE SALIVARY GLAND AND ITS NEURO-CYTOTOXIC ANTISERUM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 46, n. 3, p. 302-311, 1960.

COHEN, S.; LEVI-MONTALCINI, R. A NERVE GROWTH-STIMULATING FACTOR ISOLATED FROM SNAKE VENOM. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 42, n. 9, p. 571-574, 1956.

COLLIER, T. J.; KANAAN, N. M.; KORDOWER, J. H. Ageing as a primary risk factor for Parkinson's disease: evidence from studies of non-human primates. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 12, p. 359, 05/18/online 2011.

CONNOR, B. et al. Differential effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in the striatum and substantia nigra of the aged Parkinsonian rat. **Gene Therapy**, v. 6, n. 12, p. 1936-1951, 1999/12/01 1999.

CONTIN, M.; MARTINELLI, P. Pharmacokinetics of levodopa. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 2, p. 253-261, November 01 2010.

CORDERO-LLANA, Ó. et al. Enhanced efficacy of the CDNF/MANF family by combined intranigral overexpression in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 23, n. 2, p. 244-254, 2015.

CORDERO-LLANA, O. et al. Enhanced efficacy of the CDNF/MANF family by combined intranigral overexpression in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. **Mol Ther**, v. 23, n. 2, p. 244-54, Feb 2015.

CORDERO LLANA, O. et al. Enhanced Efficacy of the CDNF/MANF Family by Combined Intranigral Overexpression in the 6-OHDA Rat Model of Parkinson's Disease. **Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy**, v. 23, 11/05 2014.

CORDOVA, F. M. et al. In Vivo Manganese Exposure Modulates Erk, Akt and Darpp-32 in the Striatum of Developing Rats, and Impairs Their Motor Function. **PLOS ONE**, v. 7, n. 3, p. e33057, 2012.

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

CUMMINGS, J. et al. Pimavanserin for patients with Parkinson's disease psychosis: a randomised, placebo-controlled phase 3 trial. **The Lancet**, v. 383, n. 9916, p. 533-540, 2014/02/08/ 2014.

DANON, J. J.; REEKIE, T. A.; KASSIOU, M. Challenges and Opportunities in Central Nervous System Drug Discovery. **Trends in Chemistry**, 2019/05/23/ 2019.

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

DAVIES, A. M. et al. The neurotrophic hypothesis: where does it stand? **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 351, n. 1338, p. 389-394, 1996/03/29 1996.

DE LAU, L. M.; BRETHER, M. M. Epidemiology of Parkinson's disease. **Lancet Neurol**, v. 5, n. 6, p. 525-35, Jun 2006.

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, 2010/04/01/ 2010.

DIOGO, T. et al. Role of Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 23, n. 5, p. 809-838, 2017.

DODEL, R. C. et al. Costs of drug treatment in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 13, n. 2, p. 249-54, Mar 1998.

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, Jan 30 2007.

DU, H. et al. Levetiracetam Ameliorates L-DOPA-Induced Dyskinesia in Hemiparkinsonian Rats Inducing Critical Molecular Changes in the Striatum. **Parkinson's Disease**, v. 2015, p. 9, 2015.

DUGGER, B. N.; DICKSON, D. W. Pathology of Neurodegenerative Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 9, n. 7, July 1, 2017 2017.

EL ATIFI-BOREL, M. et al. De novo and long-term l-Dopa induce both common and distinct striatal gene profiles in the hemiparkinsonian rat. **Neurobiol Dis**, v. 34, n. 2, p. 340-50, May 2009.

ESKOW JAUNARAJ, K. L.; GEORGE, J. A.; BISHOP, C. L-DOPA-induced dysregulation of extrastriatal dopamine and serotonin and affective symptoms in a bilateral rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 218, p. 243-256, 2012.

FABBRINI, G. et al. Levodopa-induced dyskinesias. **Movement Disorders**, v. 22, n. 10, p. 1379-1389, 2007.

FENRICH, K.; GORDON, T. Canadian Association of Neuroscience review: axonal regeneration in the peripheral and central nervous systems--current issues and advances. **Can J Neurol Sci**, v. 31, n. 2, p. 142-56, May 2004.

FERNANDEZ, H. H. Updates in the medical management of Parkinson disease. **Cleve Clin J Med**, v. 79, n. 1, p. 28-35, Jan 2012.

FONSECA, C. P. et al. H₂O₂- or l-DOPA-injured dopaminergic neurons trigger the release of soluble mediators that up-regulate striatal GDNF through different signalling pathways. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 7, p. 927-934, 2014/07/01/ 2014.

FRERET, T. et al. Freret T, Chazalviel L, Roussel S, Bernaudin M, Schumann-Bard P, Boulouard M Long-term functional outcome following transient middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation between brain damage and behavioral impairment. **Behav Neurosci** 120:1285-1298. **Behavioral neuroscience**, v. 120, p. 1285-98, 01/01 2007.

FUMAGALLI, F. et al. Neurotrophic factors in neurodegenerative disorders : potential for therapy. **CNS Drugs**, v. 22, n. 12, p. 1005-19, 2008.

GAREA-RODRIGUEZ, E. et al. Comparative Analysis of the Effects of Neurotrophic Factors CDNF and GDNF in a Nonhuman Primate Model of Parkinson's Disease. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0149776, 2016.

GASH, D. M. et al. Functional recovery in parkinsonian monkeys treated with GDNF. **Nature**, v. 380, n. 6571, p. 252-5, Mar 21 1996.

GILL, S. S. et al. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. **Nat Med**, v. 9, n. 5, p. 589-95, May 2003.

GILL, S. S. et al. Direct brain infusion of glial cell line–derived neurotrophic factor in Parkinson disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 589-595, 2003/05/01 2003.

GIROUX, M. L. Parkinson disease: managing a complex, progressive disease at all stages. **Cleve Clin J Med**, v. 74, n. 5, p. 313-4, 317-8, 320-2 passim, May 2007.

GOLDMAN, S. M. Environmental toxins and Parkinson's disease. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 54, p. 141-64, 2014.

GOMES, M. Z.; DEL BEL, E. A. Effects of electrolytic and 6-hydroxydopamine lesions of rat nigrostriatal pathway on nitric oxide synthase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 2, p. 107-115, 2003/12/15/2003.

GUERRERO, E. et al. Recent advances in alpha-synuclein functions, advanced glycation, and toxicity: implications for Parkinson's disease. **Mol Neurobiol**, v. 47, n. 2, p. 525-36, Apr 2013.

HAMBURGER, V.; LEVI-MONTALCINI, R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. **Journal of Experimental Zoology**, v. 111, n. 3, p. 457-501, 1949.

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

HERNANDO, S. et al. Intranasal Administration of TAT-Conjugated Lipid Nanocarriers Loading GDNF for Parkinson's Disease. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 1, p. 145-155, January 01 2018.

HETZ, C.; CHEVET, E.; OAKES, S. A. Proteostasis control by the unfolded protein response. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 7, p. 829-838, 2015/07/01 2015.

HIRSCH, E. C.; JENNER, P.; PRZEDBORSKI, S. Pathogenesis of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 28, n. 1, p. 24-30, 2013.

HOFFER, B. J. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor reverses toxin-induced injury to midbrain dopaminergic neurons in vivo. **Neuroscience Letters**, v. 182, n. 1, p. 107-111, 1994/11/21/ 1994.

HOOZEMANS, J. J. M. et al. Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 354, n. 3, p. 707-711, 2007/03/16/ 2007.

HORGER, B. A. et al. Neurturin exerts potent actions on survival and function of midbrain dopaminergic neurons. **J Neurosci**, v. 18, n. 13, p. 4929-37, Jul 1 1998.

HOVLAND, D. N., JR. et al. Six-month continuous intraputamenal infusion toxicity study of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHuGDNF) in rhesus monkeys. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 5, p. 676-92, Aug 2007.

HUGHES, R. N. The value of spontaneous alternation behavior (SAB) as a test of retention in pharmacological investigations of memory. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 28, n. 5, p. 497-505, 2004/09/01/ 2004.

HUOTARINEN, A. et al. Combination of CDNF and Deep Brain Stimulation Decreases Neurological Deficits in Late-stage Model Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 374, p. 250-263, 2018/03/15/ 2018.

HUOTARINEN, A. et al. Combination of CDNF and Deep Brain Stimulation Decreases Neurological Deficits in Late-stage Model Parkinson's Disease. **Neuroscience**, v. 374, p. 250-263, Mar 15 2018.

HUTTUNEN, H. J.; SAARMA, M. CDNF Protein Therapy in Parkinson's Disease. **Cell transplantation**, v. 28, n. 4, p. 349-366, 2019.

IRAVANI, M. M. et al. GDNF reverses priming for dyskinesia in MPTP-treated, 1-DOPA-primed common marmosets. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 597-608, 2001.

JELLINGER, K. A. Neuropathology of sporadic Parkinson's disease: Evaluation and changes of concepts. **Movement Disorders**, v. 27, n. 1, p. 8-30, 2012.

JIAMING, M.; NIU, C. Comparing neuroprotective effects of CDNF-expressing bone marrow derived mesenchymal stem cells via differing routes of administration utilizing an in vivo model of Parkinson's disease. **Neurol Sci**, v. 36, n. 2, p. 281-7, Feb 2015.

JIAMING, M.; NIU, C. Comparing neuroprotective effects of CDNF-expressing bone marrow derived mesenchymal stem cells via differing routes of administration utilizing an in vivo model of Parkinson's disease. **Neurological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 281-287, February 01 2015.

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

KANG, S. S. et al. TrkB neurotrophic activities are blocked by α -synuclein, triggering dopaminergic cell death in Parkinson's disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. 10773-10778, 2017.

KATOH-SEMBA, R. et al. Age-related changes in levels of brain-derived neurotrophic factor in selected brain regions of rats, normal mice and senescence-accelerated mice: a comparison to those of nerve growth factor and neurotrophin-3. **Neuroscience Research**, v. 31, n. 3, p. 227-234, 1998/07/01/1998.

KATZENSCHLAGER, R. et al. Anticholinergics for symptomatic management of Parkinson's disease. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 2, p. CD003735, 2003.

KEMPPAINEN, S. et al. Cerebral dopamine neurotrophic factor improves long-term memory in APP/PS1 transgenic mice modeling Alzheimer's disease as well as in wild-type mice. **Behavioural Brain Research**, v. 291, p. 1-11, 2015/09/15/2015.

KORDOWER, J. H. et al. Neurodegeneration Prevented by Lentiviral Vector Delivery of GDNF in Primate Models of Parkinson's Disease. **Science**, v. 290, n. 5492, p. 767-773, 2000.

KORDOWER, J. H. et al. Disease duration and the integrity of the nigrostriatal system in Parkinson's disease. **Brain**, v. 136, n. 8, p. 2419-2431, 2013.

KORDOWER, J. H. et al. Clinicopathological findings following intraventricular glial-derived neurotrophic factor treatment in a patient with Parkinson's disease. **Ann Neurol**, v. 46, n. 3, p. 419-24, Sep 1999.

KOSTIC, V. et al. Early development of levodopa-induced dyskinesias and response fluctuations in young-onset Parkinson's disease. **Neurology**, v. 41, n. 2 (Pt 1), p. 202-5, Feb 1991.

KOTZBAUER, P. T. et al. Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. **Nature**, v. 384, n. 6608, p. 467-70, Dec 5 1996.

KRAMER, E. R. et al. Absence of Ret signaling in mice causes progressive and late degeneration of the nigrostriatal system. **PLoS Biol**, v. 5, n. 3, p. e39, Mar 2007.

LAHR, J. et al. Parkinson's Disease Patients with Dominant Hemibody Affected by the Disease Rely More on Vision to Maintain Upright Postural Control. **Percept Mot Skills**, v. 121, n. 3, p. 923-34, Dec 2015.

LANG, A. E.; ESPAY, A. J. Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations. **Mov Disord**, v. 33, n. 5, p. 660-677, May 2018.

LANG, A. E.; ESPAY, A. J. Disease Modification in Parkinson's Disease: Current Approaches, Challenges, and Future Considerations. **Movement Disorders**, v. 33, n. 5, p. 660-677, 2018.

LANG, A. E. et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. **Ann Neurol**, v. 59, n. 3, p. 459-66, Mar 2006.

LAPCHAK, P. A. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor attenuates behavioural deficits and regulates nigrostriatal dopaminergic and peptidergic markers in 6-hydroxydopamine-lesioned adult rats: comparison of intraventricular and intranigral delivery. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 61-72, 1997/02/27/ 1997.

LATGE, C. et al. The Solution Structure and Dynamics of Full-length Human Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor and Its Neuroprotective Role against alpha-Synuclein Oligomers. **J Biol Chem**, v. 290, n. 33, p. 20527-40, Aug 14 2015.

LATGE, C. et al. The Solution Structure and Dynamics of Full-length Human Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor and Its Neuroprotective Role against α -Synuclein Oligomers. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 33, p. 20527-20540, 2015.

LEHTONEN, Š. et al. Dysfunction of Cellular Proteostasis in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. 457, 2019-May-10 2019.

LEVY, Y. S. et al. Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors in Neurodegenerative Diseases. **BioDrugs**, v. 19, n. 2, p. 97-127, March 01 2005.

LEWITT, P. A. New levodopa therapeutic strategies. **Parkinsonism Relat Disord**, Sep 8 2015.

LIN, L. et al. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. **Science**, v. 260, n. 5111, p. 1130-1132, 1993.

LINDAHL, M.; SAARMA, M.; LINDHOLM, P. Unconventional neurotrophic factors CDNF and MANF: Structure, physiological functions and therapeutic potential. **Neurobiology of Disease**, v. 97, p. 90-102, 2017/01/01/ 2017.

LINDHOLM, P. et al. MANF is widely expressed in mammalian tissues and differently regulated after ischemic and epileptic insults in rodent brain. **Mol Cell Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 356-71, Nov 2008.

LINDHOLM, P. et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. **Nature**, v. 448, n. 7149, p. 73-77, 2007/07/01 2007.

LINDHOLM, P. et al. Novel neurotrophic factor CDNF protects and rescues midbrain dopamine neurons in vivo. **Nature**, v. 448, n. 7149, p. 73-7, Jul 5 2007.

LIU, H. et al. Key subdomains in the C-terminal of cerebral dopamine neurotrophic factor regulate the protein secretion. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 465, n. 3, p. 427-432, 2015/09/25/ 2015.

LOPES, M. W. et al. Time course evaluation of behavioral impairments in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 55, p. 92-100, 2016/02/01/ 2016.

- LORIGADOS PEDRE, L. et al. Nerve growth factor levels in parkinson disease and experimental parkinsonian rats. **Brain Research**, v. 952, n. 1, p. 122-127, 2002/10/11/2002.
- LOVE, S. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces neuronal sprouting in human brain. **Nat Med**, v. 11, n. 7, p. 703-4, Jul 2005.
- LUZ, M. et al. Intermittent convection-enhanced delivery of GDNF into rhesus monkey putamen: absence of local or cerebellar toxicity. **Archives of toxicology**, v. 92, n. 7, p. 2353-2367, 2018.
- MA, J. et al. Prion-Like Mechanisms in Parkinson's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 13, n. 552, 2019-June-18 2019.
- MA, K. et al. Weight Loss and Malnutrition in Patients with Parkinson's Disease: Current Knowledge and Future Prospects. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 10, p. 1-1, 2018.
- MACHADO, D. G. et al. Rosmarinus officinalis L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 158-169, 2012/08/30/2012.
- MAHATO, A. et al. **GDNF receptor agonist supports dopamine neurons in vitro and protects their function in animal model of Parkinson's disease.** 2019.
- MAIER HOEHN, M. M. Parkinsonism treated with levodopa: progression and mortality. **J Neural Transm Suppl**, v. 19, p. 253-64, 1983.
- MANFREDSSON, F. P. et al. Nigrostriatal rAAV-mediated GDNF Overexpression Induces Robust Weight Loss in a Rat Model of Age-related Obesity. **Molecular Therapy**, v. 17, n. 6, p. 980-991, 2009/06/01/2009.
- MARKS, W. J. et al. Gene delivery of AAV2-neurturin for Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 12, p. 1164-1172, 2010/12/01/2010.
- MARKS, W. J., JR. et al. Safety and tolerability of intraputaminaal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. **Lancet Neurol**, v. 7, n. 5, p. 400-8, May 2008.
- MARKS, W. J. et al. Safety and tolerability of intraputaminaal delivery of CERE-120 (adeno-associated virus serotype 2-neurturin) to patients with idiopathic Parkinson's disease: an open-label, phase I trial. **The Lancet Neurology**, v. 7, n. 5, p. 400-408, 2008/05/01/2008.
- MARSDEN, C. D.; PARKES, J. D. Success and problems of long-term levodopa therapy in Parkinson's disease. **Lancet**, v. 1, n. 8007, p. 345-9, Feb 12 1977.

- MATHEUS, F. C. et al. Temporal Dissociation of Striatum and Prefrontal Cortex Uncouples Anhedonia and Defense Behaviors Relevant to Depression in 6-OHDA-Lesioned Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 6, p. 3891-3899, 2016/08/01 2016.
- MÄTLIK, K. et al. Intrastratially Infused Exogenous CDNF Is Endocytosed and Retrogradely Transported to Substantia Nigra. **eNeuro**, v. 4, n. 1, p. ENEURO.0128-16.2017, 2017.
- MEI, J.; NIU, C. Effects of engineered conserved dopamine neurotrophic factor-expressing bone marrow stromal cells on dopaminergic neurons following 6-OHDA administrations. **Mol Med Rep**, v. 11, n. 2, p. 1207-13, Feb 2015a.
- _____. Protective and reversal effects of conserved dopamine neurotrophic factor on PC12 cells following 6-hydroxydopamine administration. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 1, p. 297-302, Jul 2015b.
- MEI, J. M.; NIU, C. S. Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation. **Neurol Sci**, v. 35, n. 8, p. 1275-80, Aug 2014.
- MELKI, R. Alpha-synuclein and the prion hypothesis in Parkinson's disease. **Rev Neurol (Paris)**, v. 174, n. 9, p. 644-652, Nov 2018.
- MENA, M. A. et al. A Synergistic Neurotrophic Response to α -Dihydroxyphenylalanine and Nerve Growth Factor. **Molecular Pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 678-686, 1998.
- MEREDITH, G. E.; KANG, U. J. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: A new look at an old problem. **Movement Disorders**, v. 21, n. 10, p. 1595-1606, 2006.
- METZ, G. A.; WHISHAW, I. Q. The ladder rung walking task: a scoring system and its practical application. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 28, p. 1204, 2009.
- MIGLIORE, M. M. et al. Neurotrophic and neuroprotective efficacy of intranasal GDNF in a rat model of Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 274, p. 11-23, 2014/08/22/ 2014.
- MOGI, M. et al. Brain-derived growth factor and nerve growth factor concentrations are decreased in the substantia nigra in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters**, v. 270, n. 1, p. 45-48, 1999/07/23/ 1999.
- MONTEIRO, E. P. et al. Aspectos biomecânicos da locomoção de pessoas com doença de Parkinson: revisão narrativa. **Revista Brasileira de Ciências do Esporte**, v. 39, p. 450-457, 2017.
- MORRISON, P. F.; LONSER, R. R.; OLDFIELD, E. H. Convective delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor in the human putamen. **J Neurosurg**, v. 107, n. 1, p. 74-83, Jul 2007.

MÜLLER, T.; MÖHR, J.-D. Recent Clinical Advances in Pharmacotherapy for Levodopa-Induced Dyskinesia. **Drugs**, v. 79, n. 13, p. 1367-1374, September 01 2019.

MWANGI, S. M. et al. Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against high-fat diet-induced obesity. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 306, n. 6, p. G515-G525, 2014.

NADELLA, R. et al. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. **Journal of Neuroinflammation**, v. 11, n. 1, p. 209, 2014/12/16 2014a.

_____. Transient transfection of human CDNF gene reduces the 6-hydroxydopamine-induced neuroinflammation in the rat substantia nigra. **Journal of neuroinflammation**, v. 11, p. 209-209, 2014b.

NASROLAHI, A. et al. Effect of cerebral dopamine neurotrophic factor on endogenous neural progenitor cell migration in a rat model of Parkinson's disease. **EXCLI journal**, v. 18, p. 139-153, 2019.

NESTLER, E. J.; CARLEZON, W. A. The Mesolimbic Dopamine Reward Circuit in Depression. **Biological Psychiatry**, v. 59, n. 12, p. 1151-1159, 2006/06/15/ 2006.

NUTT, J. G. et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. **Neurology**, v. 60, n. 1, p. 69-73, 2003.

OBESO, J. A. et al. Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 32, n. 9, p. 1264-1310, 2017.

OLANOW, C. W. Levodopa: Effect on cell death and the natural history of Parkinson's disease. **Movement Disorders**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2015.

OSSOLA, B. et al. Amantadine protects dopamine neurons by a dual action: reducing activation of microglia and inducing expression of GDNF in astroglia [corrected]. **Neuropharmacology**, v. 61, n. 4, p. 574-82, Sep 2011.

PADOVAN-NETO, F. E. et al. Effects of prolonged neuronal nitric oxide synthase inhibition on the development and expression of l-DOPA-induced dyskinesia in 6-OHDA-lesioned rats. **Neuropharmacology**, v. 89, p. 87-99, 2015/02/01/ 2015.

PALGI, M. et al. Evidence that DmMANF is an invertebrate neurotrophic factor supporting dopaminergic neurons. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 7, p. 2429-34, Feb 17 2009.

PAOLONE, G. et al. Long-Term, Targeted Delivery of GDNF from Encapsulated Cells Is Neuroprotective and Reduces Seizures in the Pilocarpine Model of Epilepsy. **J Neurosci**, v. 39, n. 11, p. 2144-2156, Mar 13 2019.

PARENT, M.; PARENT, A. Substantia nigra and Parkinson's disease: a brief history of their long and intimate relationship. **Can J Neurol Sci**, v. 37, n. 3, p. 313-9, May 2010.

PATEL, N. K. et al. Intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in PD: a two-year outcome study. **Ann Neurol**, v. 57, n. 2, p. 298-302, Feb 2005.

PATEL, N. K. et al. Benefits of putamenal GDNF infusion in Parkinson disease are maintained after GDNF cessation. **Neurology**, v. 81, n. 13, p. 1176-1178, 2013.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, v. 83, n. 2, p. 346-356, 1977/12/01/1977.

PETROVA, P. et al. MANF: a new mesencephalic, astrocyte-derived neurotrophic factor with selectivity for dopaminergic neurons. **J Mol Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 173-88, Apr 2003.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17013, 2017/03/23 2017a.

_____. Parkinson disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17013, 03/23/online 2017b.

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, 2006/12/01/2006.

PRICE, D. L. et al. Dysfunction and death of neurons in human degenerative neurological diseases and in animal models. **Ciba Found Symp**, v. 126, p. 30-48, 1987.

PRIEUR, E. A. K.; JADAVJI, N. M. Assessing Spatial Working Memory Using the Spontaneous Alternation Y-maze Test in Aged Male Mice. **Bio-protocol**, v. 9, n. 3, p. e3162, 2019/02/05 2019.

REN, X. et al. AAV2-mediated striatum delivery of human CDNF prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model. **Experimental Neurology**, v. 248, p. 148-156, 2013/10/01/2013.

REN, X. et al. AAV2-mediated striatum delivery of human CDNF prevents the deterioration of midbrain dopamine neurons in a 6-hydroxydopamine induced parkinsonian rat model. **Exp Neurol**, v. 248, p. 148-56, Oct 2013.

ROCHA, N. P. et al. Circulating levels of neurotrophic factors are unchanged in patients with Parkinson's disease. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 76, p. 310-315, 2018.

RODRIGO, N. F. et al. Neurotrophic Factors in Parkinson's Disease: What Have we Learned from Pre-Clinical and Clinical Studies? **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 31, p. 3682-3702, 2018.

RODRIGUES, T. M. et al. Challenges and Promises in the Development of Neurotrophic Factor-Based Therapies for Parkinson's Disease. **Drugs & Aging**, v. 31, n. 4, p. 239-261, April 01 2014.

RODRÍGUEZ-NOGALES, C. et al. Brain aging and Parkinson's disease: New therapeutic approaches using drug delivery systems. **Maturitas**, v. 84, p. 25-31, 2016.

SALVATORE, M. F. et al. Point source concentration of GDNF may explain failure of phase II clinical trial. **Exp Neurol**, v. 202, n. 2, p. 497-505, Dec 2006.

SARKAR, S.; RAYMICK, J.; IMAM, S. Neuroprotective and Therapeutic Strategies against Parkinson's Disease: Recent Perspectives. **Int J Mol Sci**, v. 17, n. 6, Jun 8 2016.

SCALZO, P. et al. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor correlate with motor impairment in Parkinson's disease. **Journal of Neurology**, v. 257, n. 4, p. 540-545, 2010/04/01 2010.

SCHÖNFELD, L.-M. et al. Evaluating rodent motor functions: Which tests to choose? **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 83, p. 298-312, 2017/12/01/ 2017.

SIDEROWF, A. D.; HOLLOWAY, R. G.; STERN, M. B. Cost-effectiveness analysis in Parkinson's disease: determining the value of interventions. **Mov Disord**, v. 15, n. 3, p. 439-45, May 2000.

SIMOLA, N.; MORELLI, M.; CARTA, A. R. The 6-Hydroxydopamine model of parkinson's disease. **Neurotoxicity Research**, v. 11, n. 3, p. 151-167, September 01 2007.

SLEVIN, J. T. et al. Unilateral intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in patients with Parkinson disease: response to 1 year of treatment and 1 year of withdrawal. **J Neurosurg**, v. 106, n. 4, p. 614-20, Apr 2007.

SLEVIN, J. T. et al. Improvement of bilateral motor functions in patients with Parkinson disease through the unilateral intraputamenal infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor. **J Neurosurg**, v. 102, n. 2, p. 216-22, Feb 2005.

SOUZA, R. R. et al. The usefulness of olfactory fear conditioning for the study of early emotional and cognitive impairment in reserpine model. **Behavioural Processes**, v. 100, p. 67-73, 2013/11/01/ 2013.

SPECK, A. E. et al. Treadmill Exercise Attenuates 1-DOPA-Induced Dyskinesia and Increases Striatal Levels of Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) in Hemiparkinsonian Mice. **Molecular Neurobiology**, v. 56, n. 4, p. 2944-2951, April 01 2019.

SU, C.; RATHBONE, M.; JIANG, S. Neurotrophic Regulation in Neurorestoration of the Brain. In: (Ed.), 2015. p.371-398. ISBN 9780199322299.

SULLIVAN, A. M.; TOULOUSE, A. Neurotrophic factors for the treatment of Parkinson's disease. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 157-165, 2011/06/01/ 2011.

SUN, Z.-P. et al. Intracellular trafficking and secretion of cerebral dopamine neurotrophic factor in neurosecretory cells. **Journal of Neurochemistry**, v. 117, n. 1, p. 121-132, 2011.

SVEINBJORNSDOTTIR, S. The clinical symptoms of Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, n. S1, p. 318-324, 2016.

TANRIOVER, G. et al. The effects of docosahexaenoic acid on glial derived neurotrophic factor and neurturin in bilateral rat model of Parkinson's disease. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 48, n. 3, p. 434-41, Sep 30 2010.

TATAREWICZ, S. M. et al. Development of a Maturing T-Cell-Mediated Immune Response in Patients with Idiopathic Parkinson's Disease Receiving r-metHuGDNF Via Continuous Intraputamenal Infusion. **Journal of Clinical Immunology**, v. 27, n. 6, p. 620-627, November 01 2007.

TAYLOR, H. et al. Clearance and toxicity of recombinant methionyl human glial cell line-derived neurotrophic factor (r-metHu GDNF) following acute convection-enhanced delivery into the striatum. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e56186-e56186, 2013.

TENENBAUM, L.; HUMBERT-CLAUDE, M. Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Gene Delivery in Parkinson's Disease: A Delicate Balance between Neuroprotection, Trophic Effects, and Unwanted Compensatory Mechanisms. **Front Neuroanat**, v. 11, p. 29, 2017.

THANVI, B. R.; LO, T. C. N. Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. **Postgraduate Medical Journal**, v. 80, n. 946, p. 452-458, 2004.

THORNE, R. G.; FREY, W. H. Delivery of Neurotrophic Factors to the Central Nervous System. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 40, n. 12, p. 907-946, December 01 2001.

TOMAC, A. et al. Protection and repair of the nigrostriatal dopaminergic system by GDNF in vivo. **Nature**, v. 373, n. 6512, p. 335-339, 1995/01/01 1995.

TOULORGE, D.; SCHAPIRA, A. H. V.; HAJJ, R. Molecular changes in the postmortem parkinsonian brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 139, p. 27-58, 2016.

TÜMER, N. et al. Hypothalamic rAAV-mediated GDNF gene delivery ameliorates age-related obesity. **Neurobiology of Aging**, v. 27, n. 3, p. 459-470, 2006/03/01/ 2006.

VAN DEN BERG, M. P. et al. Serial cerebrospinal fluid sampling in a rat model to study drug uptake from the nasal cavity. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 116, n. 1, p. 99-107, 2002/04/30/ 2002.

VASTAG, B. Biotechnology: Crossing the barrier. **Nature**, v. 466, n. 7309, p. 916-8, Aug 19 2010.

VIRVE, C.; MARCELLO, D. A. Matter of Life and Death: the Pharmacological Approaches Targeting Apoptosis in Brain Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 3, p. 215-229, 2011.

VISANJI, N. P. et al. PYM50028, a novel, orally active, nonpeptide neurotrophic factor inducer, prevents and reverses neuronal damage induced by MPP⁺ in mesencephalic neurons

and by MPTP in a mouse model of Parkinson's disease. **The FASEB Journal**, v. 22, n. 7, p. 2488-2497, 2008.

VITORIO, R. et al. Disease severity affects obstacle crossing in people with Parkinson's disease. **Gait Posture**, v. 40, n. 1, p. 266-9, 2014.

VOUTILAINEN, M. H. et al. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. **Exp Neurol**, v. 228, n. 1, p. 99-108, Mar 2011.

VOUTILAINEN, M. H. et al. Chronic infusion of CDNF prevents 6-OHDA-induced deficits in a rat model of Parkinson's disease. **Experimental Neurology**, v. 228, n. 1, p. 99-108, 2011/03/01/ 2011.

VOUTILAINEN, M. H. et al. Evidence for an Additive Neurorestorative Effect of Simultaneously Administered CDNF and GDNF in Hemiparkinsonian Rats: Implications for Different Mechanism of Action. **eNeuro**, v. 4, n. 1, p. ENEURO.0117-16.2017, 2017.

VOUTILAINEN, M. H. et al. Evidence for an Additive Neurorestorative Effect of Simultaneously Administered CDNF and GDNF in Hemiparkinsonian Rats: Implications for Different Mechanism of Action. **eNeuro**, v. 4, n. 1, Jan-Feb 2017.

WANG, L. et al. Therapeutic efficacy of AAV8-mediated intrastriatal delivery of human cerebral dopamine neurotrophic factor in 6-OHDA-induced parkinsonian rat models with different disease progression. **PLoS One**, v. 12, n. 6, p. e0179476, 2017.

WANG, L. et al. Therapeutic efficacy of AAV8-mediated intrastriatal delivery of human cerebral dopamine neurotrophic factor in 6-OHDA-induced parkinsonian rat models with different disease progression. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0179476-e0179476, 2017.

WANG, Y. et al. Association of low serum BDNF with depression in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism & Related Disorders**, v. 41, p. 73-78, 2017.

WARREN OLANOW, C. et al. Gene delivery of neurturin to putamen and substantia nigra in Parkinson disease: A double-blind, randomized, controlled trial. **Annals of Neurology**, v. 78, n. 2, p. 248-257, 2015.

WEAVER, F. et al. Deep brain stimulation in Parkinson disease: a metaanalysis of patient outcomes. **J Neurosurg**, v. 103, n. 6, p. 956-67, Dec 2005.

WEIS, J. et al. Trophic factors in neurodegenerative disorders. **IUBMB Life**, v. 55, n. 6, p. 353-7, Jun 2003.

WHONE, A. et al. Randomized trial of intermittent intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson's disease. **Brain**, v. 142, n. 3, p. 512-525, 2019.

WHONE, A. L. et al. Extended Treatment with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Parkinson's Disease. **J Parkinsons Dis**, v. 9, n. 2, p. 301-313, 2019.

WHONE, A. L. et al. Extended Treatment with Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor in Parkinson's Disease. **Journal of Parkinson's disease**, v. 9, n. 2, p. 301-313, 2019.

XIAO, N.; LE, Q.-T. Neurotrophic Factors and Their Potential Applications in Tissue Regeneration. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, v. 64, n. 2, p. 89-99, 2016.

YACOUBIAN, T. A.; STANDAERT, D. G. Targets for neuroprotection in Parkinson's disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 7, p. 676-87, Jul 2009.

YANKNER, B. A.; LU, T.; LOERCH, P. The Aging Brain. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, n. 1, p. 41-66, 2008.

YUE, P. et al. Intranasal Administration of GDNF Protects Against Neural Apoptosis in a Rat Model of Parkinson's Disease Through PI3K/Akt/GSK3 β Pathway. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 5, p. 1366-1374, May 01 2017.

YUREK, D. M.; FLETCHER-TURNER, A. Differential expression of GDNF, BDNF, and NT-3 in the aging nigrostriatal system following a neurotoxic lesion. **Brain Research**, v. 891, n. 1, p. 228-235, 2001/02/09/ 2001.

ZHANG, G.-L. et al. Cerebral Dopamine Neurotrophic Factor (CDNF) Has Neuroprotective Effects against Cerebral Ischemia That May Occur through the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 7, p. 1905, 2018.

ZHANG, Z. et al. Dose Response to Intraventricular Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor Administration in Parkinsonian Monkeys. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 282, n. 3, p. 1396-1401, 1997.

ZHAO, Y.-Z. et al. Gelatin nanostructured lipid carriers-mediated intranasal delivery of basic fibroblast growth factor enhances functional recovery in hemiparkinsonian rats. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 755-764, 2014/05/01/ 2014.

APÊNDICE I

Categorização de trabalhos presentes na literatura relacionados ao CDNF.

Publicações com CDNF	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	Total
Em modelos da DP	1				1	1	2	2	5	1	2	1	1	17
Relacionados à DP				1	1								3	5
Em outras doenças		1	1	1			1	2	1	2	1	4	3	17
Estrutura, mecanismo e função			1	1	1	2	3	3	2		3	3	5	24
Trabalhos de revisão	1			1	1	1		1	2	2	3	4	4	20
Outros	2		1			3		2			2	1		11
Total de publicações	4	1	3	4	4	7	6	10	10	5	11	13	13	94

Legenda: O estudo de revisão da literatura foi realizado no site PubMed, com as seguintes chaves de busca: “*CDNF*” e “*cerebral dopamine neurotrophic factor*”. De acordo com seu escopo, os artigos encontrados foram alocados em 6 diferentes classes de publicações: “Em modelos da DP”; “Relacionados à DP”; “Em outras doenças”; “Estrutura, mecanismo e função”; “Trabalhos de revisão” e “Outros” (trabalhos encontrados com as palavras-chave de busca, mas que não possuíam relação com o CDNF). Como resultado foram encontrados 94 trabalhos, entre artigos originais e de revisão.

APÊNDICE II

Curva de proteína com CDNF.

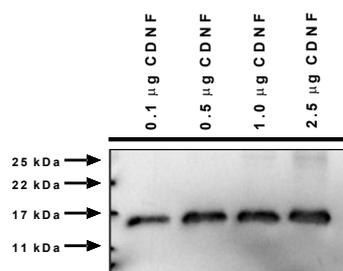
CDNF

Empresa: Sigma-Aldrich – PRS4343

Diluição do anticorpo: 1:1000

Gel SDS-PAGE 15%

Curva de proteína



Legenda: Utilizou-se a técnica de Western blotting para verificar a integridade proteica estrutural do CDNF (18,5 kDa), antes de prosseguir com sua administração intranasal. Uma curva com concentrações crescentes de proteína foi injetada em um gel SDS-PAGE 15% para realização da eletroforese, posteriormente a membrana foi incubada *overnight* com anticorpo anti-CDNF (1:1000) e relevada sua imunorreatividade com kit ABC (do complexo de biotina avidina). Na imagem podemos ver as bandas da imunodeteção de CDNF.

