

ARNALDO JORGE MARTINS FILHO

MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON: EFEITOS
NEUROTÓXICOS DA ROTENONA EM DIFERENTES POPULAÇÕES
NEURONAIS.

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração de Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências).

Orientador: Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada.

BELÉM
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ARNALDO JORGE MARTINS FILHO

MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON: EFEITOS
NEUROTÓXICOS DA ROTENONA EM DIFERENTES POPULAÇÕES
NEURONAIS.

Dissertação de mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração de Neurociências, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências).

Orientador: Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa.

Co-Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth Sumi Yamada.

BELÉM
2006

ARNALDO JORGE MARTINS FILHO

MODELO *IN VITRO* DA DOENÇA DE PARKINSON: EFEITOS
NEUROTÓXICOS DA EM DIFERENTES POPULAÇÕES
NEURONAIS.

Plano de Dissertação submetido à aprovação como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neurociências e Biologia Celular (Neurociências), pelo Curso de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, pela comissão formada pelos professores:

Orientador: Prof. Dr. Edmar Tavares da Costa
Departamento de Fisiologia, UFPA

Banca examinadora: Prof. Dr. José Luis Martins do Nascimento
Departamento de Fisiologia, UFPA

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
Departamento de Biologia, UFPA

Profa. Dr^a. Cláudia do Ó Pessoa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC

Belém, 15 de maio de 2006

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Leina de Nasaré Travassos da Rosa Costa, **em especial**, por estar sempre a meu lado, dando-me toda força e incentivo que precisei.

Aos meus avós, José Jorge da Costa e Terezinha Travassos da Rosa Costa, por ter me passado boa parte dos valores em que, hoje, acredito.

A meu padrasto, Paulo César Lopes Sousa, pela ótima pessoa que é, e por nunca ter se negado a ajudar nos momentos que precisei.

Ao meu orientador e amigo, Edmar Tavares da Costa, sempre disponível a me orientar, ajudar e aconselhar da melhor forma possível.

A minha co-orientadora, Elizabeth Sumi Yamada, a quem admiro muito pela excelente profissional que é.

A professora Dulcidéia da Conceição Palheta, por ter me ensinado a dar os primeiros passos na minha vida acadêmica.

A mestranda Lissandra Cecília dos Santos, por toda ajuda que me deu durante a execução dos experimentos do meu trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Neuropatologia Experimental, Ana Alice Batista, Brenda Nunes, Dielly Catrina Lopes, Nelson Carvalho Filho e aos demais por todos os momentos, difíceis e agradáveis, que passamos juntos.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	viii
	LISTA DE TABELAS	ix
	LISTA DE SIGLAS	x
	RESUMO	xi
	ABSTRACT	xii
1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	DOENÇA DE PARKINSON	1
1.1.1.	Terminologia	1
1.1.2.	Epidemiologia	2
1.1.3.	Características clínicas	3
1.1.4.	Crítérios para diagnóstico	5
1.1.5.	Etiologia	6
1.1.6.	Patogênese	7
1.1.7.	Os mecanismos de neurodegeneração dopaminérgica	10
1.1.8.	Tratamento	15
1.2.	MODELOS EXPERIMENTAIS NA DOENÇA DE PARKINSON	18
1.2.1.	Modelos <i>in vivo</i> da doença de Parkinson	18
1.2.1.1.	6-Hidroxidopamina	19
1.2.1.2.	MPTP	20
1.2.1.3.	Rotenona	24
1.2.1.4.	Paraquat	27
1.2.1.5.	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>	28
1.2.1.6.	<i>Drosophila</i>	30
1.2.1.7.	Camundongos transgênicos	31
1.2.2.	Modelos <i>in vitro</i> da doença de Parkinson	32
1.3.	O PAPEL DOS ÍONS CÁLCIO (Ca ²⁺) NA NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA	34
2.	OBJETIVOS	39
2.1.	OBJETIVO GERAL	39
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.	MATERIAL E MÉTODOS	40

3.1.	ANIMAIS	40
3.2.	CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS	40
3.3.	CULTURAS SEMIPURAS DE NEURÔNIOS	41
3.4.	CULTURAS MISTAS DE NEURÔNIOS/GLIA	41
3.5.	IMUNOCITOQUÍMICA	42
3.6.	TRATAMENTO COM ROTENONA	43
3.7.	O PAPEL DOS ÍONS Ca^{2+} NA TOXICIDADE DA ROTENONA	44
3.8.	ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	44
3.9.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
4.	RESULTADOS	47
4.1.	COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS E SEMIPURAS DE HIPOCAMPO E MESENCÉFALO VENTRAL	47
4.2.	CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE DE CULTURAS NEURONAIIS PRIMÁRIAS	51
4.3.	EFEITO NEUROTÓXICO DA ROTENONA SOBRE NEURÔNIOS DO MESENCÉFALO VENTRAL NÃO PARECE SER INFLUENCIADO PELO TEMPO DE EXPOSIÇÃO	57
4.4.	O PAPEL DOS ÍONS Ca^{2+} NA TOXICIDADE NEURONAL INDUZIDA POR ROTENONA	60
4.4.1.	O papel do Ca^{2+} extracelular na toxicidade induzida por rotenona em um modelo <i>in vitro</i> de DP	62
4.4.2.	O papel do Ca^{2+} microsomal na toxicidade induzida por rotenona	66
4.4.3.	O papel da captação de Ca^{2+} mitocondrial na toxicidade induzida por rotenona em um modelo <i>in vitro</i> de DP	70
5.	DISCUSSÃO	75
5.1.	COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS	75
5.2.	PADRONIZAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIIS	79
5.3.	EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À ROTENONA NA VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIIS DERIVADAS DE MESENCÉFALO VENTRAL	83
5.4.	VIAS DEPENDENTES DE ÍONS Ca^{2+} NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA	84

5.4.1.	O papel do Ca ²⁺ extracelular na toxicidade induzida por rotenona em um modelo <i>in vitro</i> de DP	84
5.4.2.	O papel do Ca ²⁺ microsomal na toxicidade induzida por rotenona em um modelo <i>in vitro</i> de DP	87
5.4.3.	O papel da captação de Ca ²⁺ mitocondrial na toxicidade induzida por rotenona em um modelo <i>in vitro</i> de DP	88
6.	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
	ANEXO 1	106
	ANEXO 2	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	(A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. (B) Representação esquemática da mesma via afetada pela DP.	9
Figura 2	Representação esquemática do metabolismo do MPTP.	23
Figura 3	Representação esquemática das vias intracelulares do MPP ⁺ .	23
Figura 4	Similaridade estrutural entre os compostos MPP ⁺ e paraquat.	28
Figura 5	Caracterização imunocitoquímica das culturas primárias derivadas de mesencéfalo e hipocampo.	49
Figura 6	Figura representativa do padrão de marcação imunocitoquímica com anticorpos anti-TH, anti-OX-42 e anti-GFAP e contra-coloração pelo método de Nissl.	50
Figura 7	Efeito de diferentes concentrações de rotenona na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo.	52
Figura 8	Efeito de diferentes concentrações de rotenona na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral.	54
Figura 9	Diferenças regionais na vulnerabilidade celular à toxicidade da rotenona em culturas derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral.	56
Figura 10	Efeito do tempo de exposição à rotenona em culturas derivadas de mesencéfalo ventral.	59
Figura 11	Influência do Ca ²⁺ extracelular na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo.	64
Figura 12	Influência do Ca ²⁺ extracelular na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral.	65
Figura 13	Influência do Ca ²⁺ microsomal na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo.	68
Figura 14	Influência do Ca ²⁺ microsomal na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral.	69
Figura 15	Influência da captação de Ca ²⁺ mitocondrial na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo.	73
Figura 16	Influência da captação de Ca ²⁺ mitocondrial na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas apresentadas por pacientes com DP idiopática.	5
Tabela 2	Principais modelos experimentais de DP e suas características.	19
Tabela 3	Caracterização imunocitoquímica de culturas neuronais derivadas de hipocampo e mesencéfalo ventral.	48
Tabela 4	Viabilidade celular dos diferentes tipos de cultura testados, expostos a 10, 20 e 30 nM de rotenona.	55
Tabela 5	Viabilidade celular de culturas mesencefálicas semipuras (MES – S) e mistas neurônio/glia (MES – M) tratadas com rotenona por sete e catorze dias.	58
Tabela 6	A influência do Ca ²⁺ extracelular na viabilidade celular em cultura de células expostas à rotenona.	63
Tabela 7	A influência do Ca ²⁺ microssomal na viabilidade celular em cultura de células expostas à rotenona.	70
Tabela 8	A influência da captação de Ca ²⁺ mitocondrial na viabilidade celular em cultura de células expostas à rotenona.	72

LISTA DE SIGLAS

6-OH-DA	6-Hidroxi-dopamina
DP	Doença de Parkinson
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado da Glia
L-DOPA	L-Di-hidroxi-fenilalanina
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
MPP+	1-metil-4-fenilpiridínio
MPTP	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NO	Óxido Nítrico
SN	Substância Negra
SNC	Sistema Nervoso Central
SNpc	Substância Negra, parte compacta

RESUMO

Evidências crescentes na literatura têm sugerido papel importante para os fatores ambientais, como a exposição a pesticidas, na patogênese da doença de Parkinson. Em animais experimentais, a exposição à rotenona, um pesticida e piscicida de uso comum, induz características de parkinsonismo através da inibição do complexo mitocondrial I. O objetivo deste estudo foi investigar a morte de neurônios induzida por rotenona utilizando culturas primárias semipuras e mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo e mesencéfalo ventral de ratos. A perda neuronal foi analisada com o ensaio colorimétrico do MTT. Nossos resultados mostraram significativa redução na viabilidade celular após exposição a rotenona de maneira dependente de concentração, mas não dependente de tempo. Nós também descobrimos uma característica marcante da degeneração de culturas neuronais induzida por rotenona. Foi observada elevada suscetibilidade em culturas mistas neurônio/glia derivadas de mesencéfalo ventral, sugerindo que a presença de glia, especialmente a microglia, é um fator importante na neurodegeneração. Além disso, como mostrado pela imunocitoquímica, este tipo de cultura apresentou elevada densidade de neurônios tirosina hidroxilase (TH)-positivos. Em termos mecanicísticos, nossos resultados com bloqueadores de Ca^{2+} mostraram um papel discreto desempenhado pelo Ca^{2+} extracelular, e uma influência sinérgica dos íons derivados dos estoques intracelulares na neurodegeneração induzida por rotenona. Este é o primeiro estudo a demonstrar os efeitos da neurodegeneração induzida por rotenona em culturas primárias de diferentes populações neuronais e um papel importante para a microglia neste processo. Os resultados deste estudo devem avançar nosso conhecimento sobre o mecanismo de ação de fatores ambientais na patogênese da doença de Parkinson.

ABSTRACT

Increasing evidence has suggested a role for environmental factors, such as exposure to pesticides, in the pathogenesis of Parkinson's disease. In experimental animals the exposure to rotenone, a common herbicide and piscicide, induces features of parkinsonism by inhibiting the activity of mitochondrial complex I. Here we propose to investigate rotenone-induced death of neurons by using primary neuron-enriched and neuron-glia cultures from the rat hippocampus and ventral mesencephalon. The neuronal loss was evaluated with the colorimetric MTT assay. Our results showed significant reduction in the cell viability after exposure to rotenone in a dose- but not in a time-dependent manner. We also discovered a remarkable feature of rotenone-induced degeneration of cultured neurons. The higher susceptibility was observed in neuron-glia cultures from the ventral mesencephalon, suggesting that the presence of glia, especially microglia, is an important factor contributing to neurodegeneration. Also, as showed by immunohistochemistry, this type of culture presented the higher density of tyrosinase (TH)-positive neurons. Mechanistically, our results with calcium blockers showed a minimal role played by external calcium, and an important synergistic influence of the ions from the internal stores in the rotenone-induced neurodegeneration. This is the first study demonstrating the neurodegenerative effects of rotenone in primary cultures of different neuronal populations and a pivotal role for the microglia in rotenone-induced degeneration of neurons. The results of this study should advance our understanding of the mechanism of action for environmental factors in the pathogenesis of Parkinson's disease.

1. INTRODUÇÃO

1.1. A DOENÇA DE PARKINSON

1.1.1. Terminologia

O termo parkinsonismo representa um conjunto de sintomas típicos da doença de Parkinson (DP), que incluem: rigidez muscular (resistência aumentada a movimentos passivos), tremor em repouso, bradicinesia (lentidão de movimentos) e instabilidade postural (equilíbrio e coordenação prejudicados). A doença de Parkinson, o segundo distúrbio neurodegenerativo mais comum relacionado à idade depois da doença de Alzheimer, foi primeiramente descrita por James Parkinson em 1817, através de sua famosa monografia “*An essay on the shaking palsy*” (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

Os achados patológicos mostram que há uma perda acentuada de neurônios dopaminérgicos na parte compacta da substância negra (SNpc) e o aparecimento de inclusões citoplasmáticas fibrilares, conhecidas como corpos de Lewy, nos neurônios remanescentes. Assim, para se obter um diagnóstico definitivo da *DP idiopática* faz-se necessária a autópsia (Samii *et al.*, 2004).

A DP esporádica ou idiopática refere-se à grande maioria dos casos diagnosticados e não possuem causa conhecida; a DP familiar e o parkinsonismo familiar são termos usados para descrever entidades relacionadas a padrões tanto autossômicos dominantes como recessivos (Samii *et al.*, 2004). O termo Parkinsonismo “plus” refere-se a síndromes parkinsonianas desenvolvidas em decorrência de outras doenças, tais como

demência com corpos de Lewy, atrofia sistêmica múltipla, paralisia supranuclear progressiva e degeneração corticobasal (Samii *et al.*, 2004).

1.1.2. Epidemiologia

A prevalência da DP em países industrializados está estimada em 0,3% da população geral e em aproximadamente 1% da população com idade acima de 60 anos, afetando mais de um milhão de pessoas na América do Norte (Samii *et al.*, 2004). A incidência desta doença aumenta consideravelmente com a idade, de 20/100.000 aos 55 anos até 120/100.000 aos 70 anos de idade. Pessoas de todas as origens étnicas podem ser afetadas, e os homens são ligeiramente mais predispostos a desenvolver este distúrbio (ver abaixo). Em pessoas com DP com início precoce, os sintomas iniciais aparecem por volta de 21 a 30 anos de idade e compreende cerca de 0,5 a 1 % dos casos de DP, enquanto que os casos de início juvenil podem se iniciar antes dos vinte anos de idade (Beal, 2001). Em aproximadamente 95 % dos casos não há aparentemente nenhuma ligação genética (DP idiopática) (Dauer & Przedborski, 2003).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência da DP é maior em homens do que em mulheres, apesar de encontrarmos valores díspares para as taxas relativas entre os dois gêneros. Por exemplo, em uma revisão feita por Shulman (2002), o autor sustenta que a DP é mais prevalente em homens a uma taxa relativa aproximada de 3:2. Em outro desses estudos, o autor demonstrou que a incidência da doença de Parkinson aumenta com a idade tanto em homens quanto em mulheres, mas a incidência no homem excede em até duas vezes a observada nas mulheres (Mayeux, 2003). No entanto, estudos mostraram que a prevalência é maior em homens em uma taxa relativa variável de 1,36

(Bauer *et al.*, 1982 apud Sawada *et al.*, 2000) a 3,7 (Li *et al.*, 1985 apud Sawada *et al.*, 1985).

1.1.3. Características clínicas

A doença de Parkinson costuma ser caracterizada, desde o início do século XIX, como uma combinação de tremor, rigidez e lentidão ou pobreza de movimentos — esta última característica quase sempre confundida com fraqueza, como exemplificado pelo primeiro termo a denominar esta condição: ‘Paralisia Agitante’. À medida que as observações clínicas foram sendo aperfeiçoadas, tornou-se cada vez mais difícil trabalhar com uma simples definição clínica de DP, muito em função de que combinações semelhantes de sinais e sintomas, começaram a ser reconhecidas como uma consequência de certas infecções (encefalite letárgica), drogas, intoxicações (neurotoxina MPTP – ver adiante), trauma (encefalopatia do pugilato) e outras desordens neurodegenerativas (e.g., paralisia supranuclear progressiva).

No decorrer do século XX, o desenvolvimento da patologia microscópica incorporou novos achados morfológicos, capazes de melhorar a classificação da doença. Assim, no caso da DP, tornou-se uma condição imprescindível para o diagnóstico *post-mortem* de todos os casos verdadeiros da doença a presença, nos neurônios remanescentes da substância negra, de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas arredondadas, com um halo claro, denominadas corpos de Lewy, primeiramente descritos por Fredrich Lewy.

Ao final do século XX, no entanto, esta base sólida para o diagnóstico começou a mostrar deficiências, de vez que em 1991, Rajput e colaboradores descreveram casos de pacientes que apresentavam todas as características clínicas da DP, mas com emaranhados

neurofibrilares nos neurônios da substância negra, ao invés dos corpos de Lewy. Adicionalmente, foram relatados casos de diagnóstico de corpos de Lewy no encéfalo de indivíduos neurologicamente normais e em diversas outras desordens neurodegenerativas que não poderiam ser confundidas com a DP – como é o caso da doença de Hallervorden–Spatz e a pan-encefalite esclerosante subaguda (Calne, 2004).

Mesmo com todas as controvérsias, algumas destacadas nos parágrafos anteriores, pode-se destacar os seguintes critérios de inclusão para o diagnóstico da doença: presença dos sinais clássicos de tremor em repouso, rigidez muscular e bradicinesia, com instabilidade postural. A instabilidade postural, por vezes, é considerada como característica cardinal, mas não é específica e geralmente está ausente no início da doença. O tremor em repouso é o principal sintoma em cerca de 70% dos pacientes, diminuindo em atos de movimento voluntário. A rigidez é destacada por uma resistência no movimento das articulações. E a bradicinesia normalmente é o primeiro sintoma no início da DP, caracterizada por uma lentidão dos movimentos. O início da doença é lento e os déficits são geralmente assimétricos. Há progressão inexorável da doença, assim como resposta mantida a drogas dopaminérgicas (desde que tolerados em doses normais). Os corpos de Lewy são achados comuns na SNpc. A perda neuronal é também predominante nesta região, o que leva a diminuição da disponibilidade de dopamina no estriado, com um gradiente rostrocaudal (perda maior na porção caudal). Outros sinais motores também podem ser observados em alguns pacientes, tais como: hipocinesia (redução na amplitude de movimentos), acinesia (ausência de movimentos inconscientes), hipomimia (diminuição da expressão facial normal) e hipofonia (diminuição do volume da voz) (Tabela 1) (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

Além destas características motoras, várias outras características tipicamente não-motoras são observadas, incluindo disfunções autonômicas e cognitivas, mudanças psiquiátricas, sintomas sensoriais e distúrbios no sono (Tabela 1) (Samii *et al.*, 2004).

Tabela 1: Características clínicas apresentadas por pacientes com DP idiopática

Sinais motores clássicos	Sinais motores secundários	Sinais não-motores
Tremor em repouso	Hipocinesia	Depressão
Rigidez muscular	Acinesia	Distúrbios no sono
Bradicinesia	Hipomímia	Demência (mais frequente em pacientes idosos)
Instabilidade postural	Hipofonia	Lentidão de processos cognitivos
	Micrografia	Disfunções autonômicas (maior frequência urinária, constipação)
		Comportamento psicótico

1.1.4. Critérios para diagnóstico

Um diagnóstico definitivo para DP necessita de autópsia, com identificação de perda neuronal dopaminérgica e formação de corpos de Lewy no citosol de neurônios dopaminérgicos remanescentes. Em vida, a DP normalmente é diagnosticada clinicamente, não sendo necessários testes de laboratório ou técnicas de neuroimagem. Devido a isso, o diagnóstico clínico para esta doença tem se tornado mais rigoroso, com graduações na sua certeza, com a inclusão de diversas escalas, como por exemplo: clinicamente possível, clinicamente provável e clinicamente definitivo; o diagnóstico é considerado clinicamente definitivo após avaliação da resposta ao tratamento com drogas dopaminérgicas (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

1.1.5. Etiologia

A causa para DP esporádica ainda é desconhecida. Considera-se atualmente que a DP seja resultado de múltiplos fatores, incluindo envelhecimento natural, susceptibilidade genética e exposição a fatores ambientais (Samii *et al.*, 2004; Shimohama *et al.*, 2003). Embora a incidência deste distúrbio se eleve com a idade, normalmente não se aceita que a causa seja apenas um reflexo do processo de envelhecimento natural (Samii *et al.*, 2004).

Além disso, apesar da maior parte das pessoas com DP não apresentarem história familiar, nove *loci* gênicos autossômicos, dominantes ou recessivos, já foram identificados. Assim, já foram descritas mutações raras nos genes que codificam as proteínas α -sinucleína e hidrolase L1 carboxi-terminal da ubiquitina em casos familiares de DP autossômica dominante (Polymeropoulos, 1997; Shimohama *et al.*, 2003), enquanto que algumas mutações no gene da parquína, PARK2, estão envolvidas com o desenvolvimento de DP autossômica recessiva de início juvenil (Kitada, 1998).

Um outro componente importante na etiologia da doença está representado por fatores ambientais, tais como a exposição a pesticidas, o ambiente rural e o consumo de água não-potável, o que aumenta consideravelmente a predisposição da pessoa a desenvolver uma síndrome parkinsoniana (Samii *et al.*, 2004). Um risco ambiental adicional para a DP é a exposição ocupacional a metais pesados, entre os quais podemos destacar o manganês, o alumínio e o ferro (Sherer *et al.*, 2002). A exposição ocupacional ao manganês está envolvida no aumento da predisposição ao desenvolvimento de uma síndrome parkinsoniana (Tanner, 1992). O alumínio possui propriedades neurotóxicas, atuando na inibição da via glicolítica no sistema nervoso central (SNC), no bloqueio do

metabolismo de ácidos nucléicos e na interferência com o magnésio na regulação de receptores de neurotransmissores (Lai & Blass, 1984). O ferro é um dos mais importantes elementos do corpo, porém sua deficiência e seu excesso estão envolvidos na patofisiologia de diferentes desordens no SNC. Sua acumulação no SNC tem sido envolvida no desenvolvimento de diversos distúrbios neurológicos, entre eles o mal de Alzheimer e a doença de Parkinson (Sadrzadeh e Saffari, 2004).

1.1.6. Patogênese

O achado patológico característico na DP é uma diminuição nas projeções da SNpc para os núcleos caudado e putamen (neostriado), devido à morte acentuada da população de neurônios dopaminérgicos daquele núcleo (Figura 1). Inclusões fibrilares no citoplasma dos neurônios dopaminérgicos remanescentes, conhecidas como corpos de Lewy, são as marcas citopatológicas da doença. Os sinais clínicos tornam-se evidentes quando cerca de 80% da dopamina estriatal e cerca de 60% da população de neurônios dopaminérgicos são perdidos. Os corpos de Lewy não estão confinados na substância negra e podem ser vistos em outras regiões, assim como em patologias diversas, tanto no SNC (e.g., córtex, amígdala, *locus coeruleus*, núcleo vagal) quanto no sistema nervoso periférico (Dauer & Przedborski, 2003; Samii *et al.*, 2004).

Estudos patológicos relacionados a neurodegeneração na DP sugerem um conjunto de achados característicos. Primeiro, a perda de neurônios dopaminérgicos associada à DP tem uma característica topológica distinta do padrão visto no envelhecimento normal. Na DP, a perda celular está concentrada nas porções caudal e ventrolateral da SNpc, enquanto que durante o envelhecimento normal, a porção

dorsomedial da substância negra (SN) é a região mais afetada. Segundo, o grau da perda de terminais neuronais no estriado é maior do que a perda de neurônios na SN. Terceiro, o mecanismo de remoção da dopamina parece ser mais dependente de seu transportador no estriado do que no córtex pré-frontal, onde outros transportadores monoaminérgicos e a enzima catecol-O-metiltransferase (COMT) desempenham um papel maior no término das ações da dopamina (Dauer & Przedborski, 2003). Adicionalmente, observa-se no estriado uma drástica redução nos níveis de dopamina, seus metabólitos - ácidos homovanílico e 3,4-dihidroxifenilacético - e receptores (Shimohama *et al.*, 2003).

Embora a marca patológica da DP seja a perda de neurônios dopaminérgicos, este processo degenerativo se estende para outras populações neuronais. A neurodegeneração e a formação de corpos de Lewi são também observadas nos sistemas de neurotransmissão noradrenérgico (*locus coeruleus*), serotoninérgico (núcleo da rafe) e colinérgico (núcleo basal de Meynert, núcleo motor dorsal do nervo vago), assim como no córtex cerebral (especialmente os córtices cingulado e entorrinal), bulbo olfatório e no sistema nervoso autônomo (Dauer & Przedborski, 2003). De todos esses sítios, acredita-se que a neurodegeneração observada em estruturas do hipocampo e nos “inputs” corticais colinérgicos contribuem de maneira especialmente relevante para os quadros de demência elevada, observada especialmente quando a DP se manifesta em pacientes mais idosos.

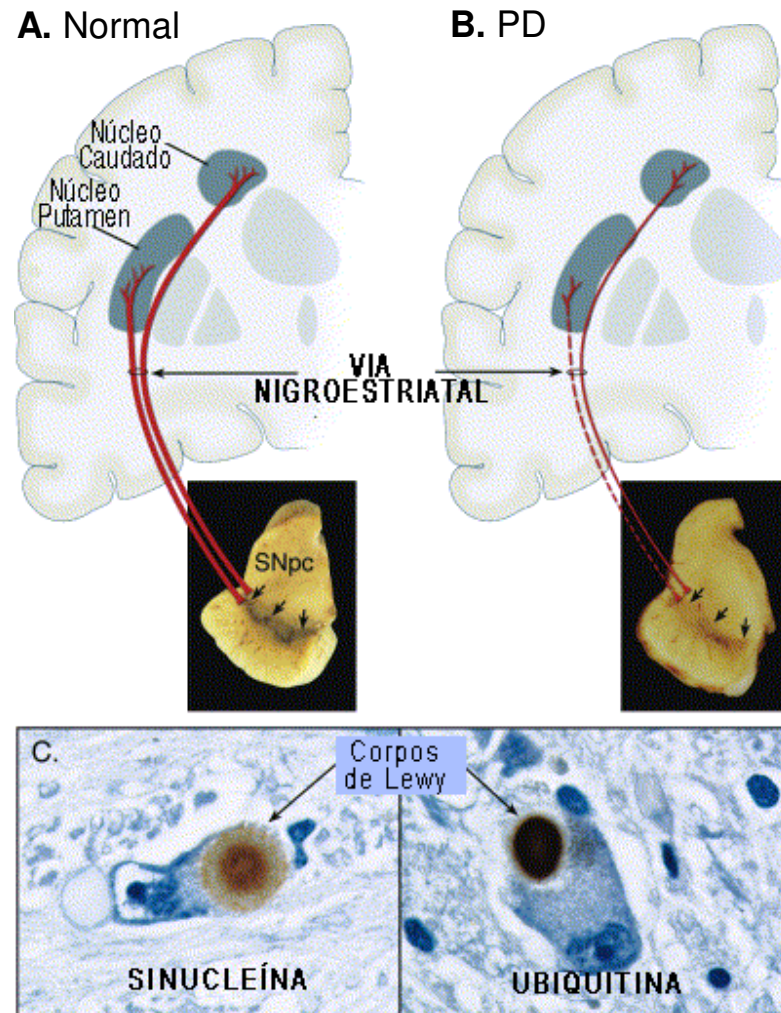


Figura 1. (A) Representação esquemática da via nigroestriatal normal. Os neurônios dopaminérgicos da SNpc (setas), projetam (linhas vermelhas sólidas) para o estriado (núcleos caudado e putamen). (B) Representação esquemática da mesma via afetada pela DP: degeneração (setas) e acentuada perda de neurônios dopaminérgicos que projetam para o putamen (linha tracejada), com perda mais modesta dos que projetam para o caudado (linha vermelha fina). (C) Imunocitoquímica dos corpos de Lewy em neurônios dopaminérgicos da SNpc confirma que os mesmos apresentam agregados de alfa-sinucleína (esquerda) e ubiquitina (direita). Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).

1.1.7. Os mecanismos de neurodegeneração dopaminérgica

A neurodegeneração observada na DP pode estar relacionada a diversos fatores, que incluem disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, excitotoxicidade, apoptose e inflamação (Samii *et al.*, 2004), não descartando, também, o possível papel da expressão de proteínas defeituosas, com a conseqüente formação de agregados protéicos intracelulares (Dauer & Przedborski, 2003).

A possibilidade de que um defeito na fosforilação oxidativa desempenhe um papel na patogênese da DP começou a ser levantada com a descoberta de anormalidades na atividade do complexo I mitocondrial em pacientes (Dauer & Przedborski, 2003). Tais anormalidades não estão confinadas ao SNC, sendo encontradas também em plaquetas de pacientes com DP idiopática (Schapira *et al.*, 1990 apud Dauer & Przedborski, 2003; Parker *et al.*, 1989 apud Dauer & przedborski, 2003).

Aproximadamente 100% do oxigênio molecular são consumidos na respiração mitocondrial, sendo produzidos, como resultado deste processo, moléculas altamente oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical superóxido (O_2^{\bullet}), conhecidas espécies reativas do oxigênio (ERO). O radical superóxido pode ser convertido em peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase. O peróxido de hidrogênio, então, é convertido em água sob ação da enzima catalase, porém ele também pode reagir com íons Fe^{2+} , através da reação de Fenton, promovendo a formação de radicais hidroxila (OH^{\bullet}) altamente reativos. O radical superóxido também pode reagir com o óxido nítrico (NO), formando peroxinitrito ($ONOO^-$). O peroxinitrito, então, pode causar danos celulares reagindo com ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (Stahl & Sies, 2002). A

inibição do complexo I pode aumentar a produção dessas ERO, potencializando seus efeitos deletérios para as células. Um alvo para essas ERO pode ser a própria cadeia transportadora de elétrons, levando a danos mitocondriais e aumento adicional na produção de ERO, gerando um ciclo vicioso e extremamente tóxico para a célula (Dauer & Przedborski, 2003).

De acordo com isto, alguns estudos *post-mortem* verificaram evidências tanto de danos oxidativos quanto de uma diminuição na atividade do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial na substância negra de pacientes com DP (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

Os neurônios dopaminérgicos podem estar em um microambiente particularmente fértil para a geração de ERO: o próprio metabolismo da dopamina produz peróxido de hidrogênio e radicais superóxido. Além disso, a própria auto-oxidação da dopamina, que leva a produção de melanina na SN, também gera subprodutos tóxicos para a célula, tais como a dopamina-quinona, uma molécula que danifica proteínas através da reação com resíduos de cisteína (Graham, 1978 *apud* Dauer & Przedborski, 2003), e peróxido de hidrogênio, que se decompõe em radicais hidroxila (Sherer *et al.*, 2002).

A presença de ERO pode aumentar a quantidade de proteínas defeituosas, elevando a demanda do sistema de proteossomo da ubiquitina. A deposição anormal de proteínas no SNC é uma característica de várias doenças neurodegenerativas relacionadas à idade, e a DP não é exceção. Proteínas defeituosas, solúveis ou agregadas, podem diretamente causar danos, possivelmente pela deformação causada às células ou pela interferência no tráfico intracelular. Inclusões protéicas podem, também, seqüestrar proteínas que são importantes para a sobrevivência celular. Neste aspecto, existem dois

¹ Sistema de proteossomo da ubiquitina: sistema de degradação protéica não lisossômico que degrada e controla precisamente a

focos em estudo na DP esporádica: um que diz respeito à disfunção de proteínas e outro ao sistema de proteossomo, que podem, ambos, contribuir indiretamente para a acumulação de proteínas defeituosas (Dauer & Przedborski, 2003).

Na DP, os corpos de Lewy contêm a proteína α -sinucleína modificada por oxidação, exibindo assim, em experimentos *in vitro*, uma maior tendência à agregação (Giasson *et al.*, 2000). Vários herbicidas, como a rotenona e o paraquat, induzem defeitos e agregação de α -sinucleína (Betarbet *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Manning-Bog *et al.*, 2002; Uversky *et al.*, 2001).

Outro fator importante na DP é a intensa reação glial que ocorre concomitante à degeneração de neurônios dopaminérgicos, e que geralmente é considerada como um evento não específico desta doença, pois ocorre também em outros distúrbios neurológicos, tais como na doença de Alzheimer e no infarto cerebral, bem como em modelos experimentais de DP (Gao *et al.*, 2003). Entretanto, evidências em humanos (Langston & Ballard Jr, 1983; Langston *et al.*, 1983; Langston *et al.*, 1999), assim como estudos com animais (Gao *et al.*, 2002; Herrera *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2000), têm sugerido que a inflamação pode ser um fenômeno ativo na DP, promovendo continuamente a morte celular neste processo neurodegenerativo. O que se especula é o fato de que, após uma lesão primária de origem ambiental ou genética, o processo inflamatório decorrente da reação glial possa perpetuar a degeneração de neurônios dopaminérgicos (Hartmann *et al.*, 2003).

A resposta inflamatória é a primeira linha de defesa contra lesões e infecção no SNC; entretanto, uma resposta inflamatória excessiva pode também ser uma fonte adicional de danos às células do hospedeiro. No SNC, a principal marca da inflamação é a ativação

de células gliais, particularmente a microglia. As células microgliais, consideradas células do sistema imunológico residentes no SNC, são sensíveis aos menores distúrbios na homeostase no encéfalo e tornam-se ativadas em muitas condições neuropatológicas, como doença de Alzheimer, DP, esclerose múltipla, demência na AIDS, trauma e derrame. Com a ativação, a microglia sofre algumas mudanças em sua plasticidade funcional, transformando-se em células semelhantes aos macrófagos; tais mudanças envolvem mudanças morfológicas, proliferação, aumento na expressão de receptores de superfície e produção de fatores neurotróficos e neurotóxicos. A microglia ativada, assim, pode contribuir com danos adicionais devido a liberação desses fatores, que incluem TNF- α , IL-1, radicais livres (ERO e espécies reativas de nitrogênio), proteases, eicosanóides e aminoácidos excitatórios. Por outro lado, alguns aspectos da inflamação podem realmente ser benéficos contra danos no SNC; por exemplo, ao passo que se acredita que a microglia secreta fatores primariamente neurotóxicos, por outro lado a astroglia atua como fonte primária de fatores neurotróficos, embora a microglia e a astroglia ativadas produzam, ambas, fatores neurotróficos e citocinas inflamatórias. Além disso, a microglia ativada também pode exibir um efeito neuroprotetor através da remoção de debris celulares, destruição de patógenos e liberação de fatores neurotróficos, enquanto que os astrócitos podem contribuir com a sobrevivência neuronal pela eliminação de substâncias tóxicas, liberação de neurotrofinas e promoção de reparo tecidual. Entre esses efeitos benéficos, a elevada liberação de fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, do inglês “glia-derived neurotrophic factor”) é uma das principais substâncias pela qual a glia ativa exerce atividade neuroprotetora (Gao *et al.*, 2003).

Outro ponto importante no que concerne à patogênese da DP, e que ainda permanecerem sob investigação, são os mecanismos pelos quais a disfunção na atividade do complexo mitocondrial I leva à neurodegeneração dopaminérgica. Neste ponto de vista, diversas hipóteses podem ser levantadas; uma abordagem interessante foge um pouco da chamada “teoria da dopamina” e defende que a atividade reduzida do complexo I pode causar, além de danos oxidativos, o fenômeno de excitotoxicidade. Além disso, disfunções na atividade deste complexo podem levar a alterações nos níveis de ATP, ou prejudicar a homeostase dos íons cálcio (Ca^{2+}), ou ambos (Sherer *et al.*, 2002). Assim, diminuições nos níveis de ATP podem prejudicar a atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase, resultando em despolarização neuronal parcial por promover diminuição no gradiente de concentração dos íons K^+ . Tal despolarização diminui o bloqueio dependente de voltagem promovido por íons magnésio (Mg^{2+}) sobre o receptor glutamatérgico do tipo NMDA. Sob essas condições, desde que haja disponibilidade de glutamato na fenda, pode ocorrer excitotoxicidade mediada pela ativação desses receptores glutamatérgicos e conseqüente elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular. Tanto a magnitude como a duração desta elevação transitória nos níveis intracelulares de Ca^{2+} podem ser aumentadas pela atividade reduzida da enzima Ca^{2+} -ATPase, ou ainda pela falha na captação de Ca^{2+} pela mitocôndria. Assim, uma disfunção na atividade do complexo I pode levar a uma ativação anormal do receptor de glutamato do tipo NMDA e, ao mesmo tempo, promover maiores insultos à população de neurônios dopaminérgicos da SNpc (Sherer *et al.*, 2002).

1.1.8. Tratamento

Poucas doenças neurológicas têm recebido tanta atenção e investimento em pesquisa como a doença de Parkinson. Embora tenham ocorrido avanços no que se refere ao desenvolvimento de agentes para tratamento desta desordem, nenhum destes estava endereçado ao problema subjacente e primário, representado pela progressiva perda de neurônios dopaminérgicos. As estratégias terapêuticas atuais para a doença de Parkinson têm o objetivo de reduzir a severidade dos sintomas, com o uso de quatro categorias principais de drogas: (1) anticolinérgicos, (2) agonistas de receptores dopaminérgicos, inibidores da MAO e (4) L-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA).

As drogas anticolinérgicas são normalmente usadas em pacientes jovens cujo tremor é o principal sintoma; entretanto, esta intervenção terapêutica pode provocar efeitos colaterais, tais como náuseas, hipotensão, sonolência e alucinações.. Em pacientes menos idosos ou com síndromes parkinsonianas mais brandas, o tratamento normalmente começa com agonistas dopaminérgicos, como a apomorfina, por exemplo; esta classe foi a primeira a ser utilizada no tratamento da DP (há cerca de 50 anos), porém a longo prazo, a terapia com este tipo de fármaco promove flutuações motoras e discinesias. Os inibidores da MAO, como a selegilina, apesar de possuir possíveis efeitos neuroprotetores, são úteis no tratamento da DP pela redução na degradação da dopamina liberada pelos terminais nervosos; em contrapartida, esta classe de medicamentos pode promover efeitos colaterais simpaticomiméticos; além disso, a selegilina pode gerar metabólitos com efeitos semelhantes a anfetaminas, sendo responsáveis por efeitos colaterais psicotóxicos. Em relação a L-DOPA, é o tratamento sintomático mais eficaz contra a DP; é um precursor da dopamina que atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica, e geralmente é combinada

a um inibidor da dopa-descarboxilase, como a carbidopa ou a benzerazida, para prevenir a conversão periférica da L-DOPA a dopamina; passou a ser utilizada clinicamente há cerca de 30 anos; além disso, a administração de L-DOPA após um longo período promove flutuações motoras, com crises de discinesias difásicas, e os pacientes podem vir a sofrer com períodos de mobilidade e imobilidade, em decorrência do início e fim do efeito da droga, característica conhecida como efeito “on-off” (Samii *et al.*, 2004; Thobois *et al.*, 2005).

Por encontrar-se bem estabelecido na literatura que a neuroinflamação é um importante contribuinte para o processo crônico degenerativo em modelos *in vivo* e *in vitro* de DP, e talvez para a própria DP idiopática, inúmeros estudos experimentais têm apostado na inibição da inflamação como uma estratégia terapêutica promissora, resultando em atenuação na degeneração dopaminérgica nigroestriatal em modelos de DP (Gao *et al.*, 2003). Terapeuticamente, no entanto, o uso de drogas antiinflamatórias para prevenir a degeneração de neurônios dopaminérgicos na DP ainda não foi formalmente testado em pacientes.

Explorando esta possibilidade, experimentos em que camundongos sofrem deleção de proteínas pró-inflamatórias, tais como a ciclooxigenase-2 e a óxido nítrico sintase induzível, mostram proteção significativa contra a toxicidade induzida por MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina) (Liberatore *et al.*, 1999; Teismann *et al.*, 2003). Em outra série de experimentos, a dexametasona, um esteróide antiinflamatório, mostrou inibir parcialmente a reação microglial, diminuindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e óxido nítrico e, conseqüentemente, atenuando a degeneração de neurônios

dopaminérgicos induzida por MPTP (Kurkowska-Jastrzebska *et al.*, 1999) e LPS (Castano *et al.*, 2002).

Baseando-se na hipótese de que a microglia está envolvida na perda neuronal, a minociclina, um antibiótico que possui propriedades antiinflamatórias, é uma droga promissora que tem sido bastante testada *in vivo*, interferindo na ativação de enzimas da via apoptótica, e que tem mostrado ser altamente protetora em um modelo experimental de DP (He *et al.*, 2001). O salicilato de sódio e a naxolona, que são drogas que atuam impedindo o aumento dos níveis de radicais livres nas células, e que também influenciam na resposta inflamatória, também estão sendo testadas em experimentos *in vitro* (Gao *et al.*, 2003).

Outro método que ainda está em fase inicial de estudo é a utilização de transplante de células tronco derivadas de tecido cadavérico fetal, com o objetivo de repovoar o tecido nervoso que sofreu degeneração. Em um desses estudos, em que se utilizou transplante de tecido mesencefálico fetal, observou-se nível satisfatório de sobrevivência das células transplantadas, com melhora dos sinais e sintomas apresentados por pacientes com DP grave, em especial os menos idosos (Freed, 2001). Além disso, pode-se usar também células-tronco da medula óssea, pois elas poderiam se diferenciar tanto em células produtoras de dopamina como em células que liberam certos fatores neurotróficos, como o GDNF, podendo promover migração de células para o local afetado (Samii *et al.*, 2004).

1.2. MODELOS EXPERIMENTAIS NA DOENÇA DE PARKINSON

1.2.1. Modelos *in vivo* da doença de Parkinson

A fim de demonstrar relevância direta com a DP humana, um modelo animal ideal deve ter as seguintes características: (1) apresentar uma população normal de neurônios dopaminérgicos ao nascimento, em que possa ser promovida perda seletiva e gradual no início da idade adulta como resultado da manipulação experimental; (2) o modelo deve gerar déficits motores facilmente detectáveis, incluindo os sinais cardinais da DP em humanos; (3) o modelo deve mostrar o desenvolvimento de corpos de Lewy característicos na população de neurônios dopaminérgicos poupados pela experimentação; (4) se o modelo for genético, deve ser baseado em uma simples mutação que permita sua propagação normal; e, finalmente, (5) deve ter um curso de desenvolvimento relativamente rápido, de alguns meses, permitindo avaliação rápida com menor custo terapêutico (Beal, 2001).

Os modelos animais de DP mais comumente utilizados atualmente são os seguintes (ver Tabela 2):

Tabela 2: Principais modelos experimentais de DP e suas características. 6-OH-DA, 6-hidroxidopamina; MPTP, 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; LPS, Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

Modelos	Déficits motores	Corpos de Lewy	Tempo de curso	Comentários
6-OH-DA	Sim	Não	Pequeno	Efetiva em camundongos, ratos, gatos e primatas.
MPTP	Sim	Não	Pequeno	Roedores são menos sensíveis.
Rotenona	Sim	Sim	Pequeno	Efetiva em ratos Lewis.
Paraquat	Sim	Sim	Pequeno	Ainda pouco se sabe se sua toxicidade é seletiva para neurônios dopaminérgicos.
LPS			Variável	Utilizado para estudar o papel da resposta inflamatória.
Drosophila	Sim	Sim	Pequeno	Resposta a agonistas de receptores dopaminérgicos não está clara.
Camundongos transgênicos	Sim	Sim	Longo (\cong 1 ano)	Resultados inconsistentes. Corpos de Lewis presentes no núcleo e no citoplasma.

1.2.1.1. 6-hidroxidopamina (6-OH-DA)

Este análogo da dopamina foi o primeiro agente usado como modelo de DP, há cerca de 30 anos atrás. Como a 6-OH-DA não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, este modelo baseia-se na injeção do composto diretamente na estrutura cerebral que se deseja lesar (comumente na SN ou no estriado), onde vai se acumular seletivamente nos neurônios dopaminérgicos, promovendo a degeneração desta população de neurônios, possivelmente pela geração de radicais livres. É uma toxina efetiva em ratos, camundongos, gatos e primatas, animais onde tem sido predominantemente usada para produzir lesões unilaterais. Não resulta na formação de corpos de Lewy na SN e pode produzir danos não específicos a outras populações de neurônios (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

Em ratos, a extensão da depleção de dopamina como resultado da administração de 6-OH-DA pode ser avaliada farmacologicamente. Devido à lesão provocada pela 6-OHDA, os animais apresentam comportamento motor assimétrico quando submetidos à aplicação de agonistas de receptores da DA, como a apomorfina, que resulta em rotações contralaterais. A administração de agonistas indiretos, tais como a anfetamina, que promove liberação de dopamina de neurônios no lado contralateral, produz rotações ipsilaterais (Gerlach & Riederer, 1996; Hirschhorn *et al.*, 1983). Esta é a principal vantagem deste modelo, a indução de déficits motores quantificáveis (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

1.2.1.2. MPTP

Enquanto que o achado neuropatológico característico da DP idiopática, a morte de neurônios da substância negra, é conhecido há mais de 60 anos, ainda hoje não se conhecem as causas para que esta degeneração ocorra. Parte dessa resposta pode derivar de pesquisas realizadas com uma neurotoxina conhecida como MPTP. Este composto tem se mostrado seletivamente tóxico para os neurônios da substância negra, e capaz de originar nos animais a maioria dos sinais e sintomas da DP idiopática.

O MPTP foi primeiramente investigado em função de seu possível uso terapêutico em 1947, mas os animais (primatas) aos quais a droga foi administrada desenvolveram rigidez e ficaram incapazes de se mover, eventualmente chegando ao óbito.

Décadas mais tarde, em 1976, ocorreu o primeiro caso de parkinsonismo causado por MPTP, quando um estudante universitário americano que tentava produzir para consumo próprio o MPPP (1-metil-4-fenil-4-propionoxipiperidina), um composto

narcótico ilícito, considerado à época um tipo de heroína sintética, cometeu um erro e produziu o MPTP. Dentro de três dias, este indivíduo desenvolveu parkinsonismo grave. Dois anos depois, cometeu suicídio e a autópsia revelou perda neuronal acentuada na substância negra, em um padrão de lesão muito semelhante ao observado em pacientes com DP (Langston *et al.*, 1984).

Em 1982, o MPPP foi novamente manufaturado e vendido nas ruas como heroína sintética. Lotes contaminados com MPTP também chegaram às ruas, causando efeitos devastadores em usuários jovens (Langston *et al.*, 1983). Logo se descobriu que este dano permanente aos neurônios da substância negra era causado pelo MPTP, que se tornava a primeira droga conhecida a causar a DP idiopática. Desde então o MPTP tem sido usado em modelos experimentais de DP (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

O aspecto mais fascinante da descoberta do MPTP é o de ter demonstrado para a comunidade científica a possibilidade de uma causa ambiental para a doença. Além disso, os achados iniciais relacionando o MPTP com a DP adicionaram outra dimensão ao estudo da doença, pois embora o MPTP não seja a causa da DP idiopática, sugere uma base química para a doença que, eventualmente, poderá levar a descobertas posteriores nesta área e à possibilidade de uma cura química.

O MPTP é altamente lipofílico e atravessa facilmente a barreira hematoencefálica. No SNC ele é convertido no seu metabólito ativo, 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP⁺), dentro de células da glia, pela enzima monoamina oxidase-B (MAO-B), envolvida na degradação de catecolaminas. Em seguida, o MPP⁺ é lançado para o meio extracelular de onde será captado por transportadores de dopamina (DAT, do inglês *dopamine transporters*) da membrana plasmática dos neurônios, com os quais tem alta afinidade,

acumulando-se, assim, no interior de neurônios dopaminérgicos (Figura 2). Dentro dos neurônios o MPTP pode percorrer três vias: (1) pode ser captado por transportadores vesiculares de monoaminas e armazenado dentro de sinaptossomos, (2) pode permanecer no citosol e interagir com enzimas citoplasmáticas, ou (3) pode ser captado e concentrado dentro de mitocôndrias, onde irá inibir o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (Figura 3). Esta última via pode provocar redução na geração de ATP, além do aumento na produção de radicais livres, extremamente danosos para a célula, induzindo morte celular por apoptose.

Além do dano supramencionado, outros dois tipos de disfunções celulares têm sido focalizados na patogênese da DP experimental induzida por MPTP: o estresse oxidativo e a agregação anormal de proteínas (Dauer & Przedborski, 2003). Experimentos *in vitro* em mitocôndrias isoladas de cérebro inteiro demonstram que a atividade do complexo I pode ser inibida em até 70% (Davey & Clark, 1996), mas dados de tecidos *post-mortem* mostram uma inibição de apenas 40% nesta atividade (Schapira *et al.*, 1990 *apud* Dauer & Przedborski, 2003). Em um raro estudo retrospectivo em humanos, análises neuropatológicas de três pacientes expostos ao MPTP por um período de 3-16 anos mostraram vestígios de microglia ativada circundando e promovendo morte celular (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

Figura 2: Representação esquemática do metabolismo do MPTP. DAT, transportador de dopamina. Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).

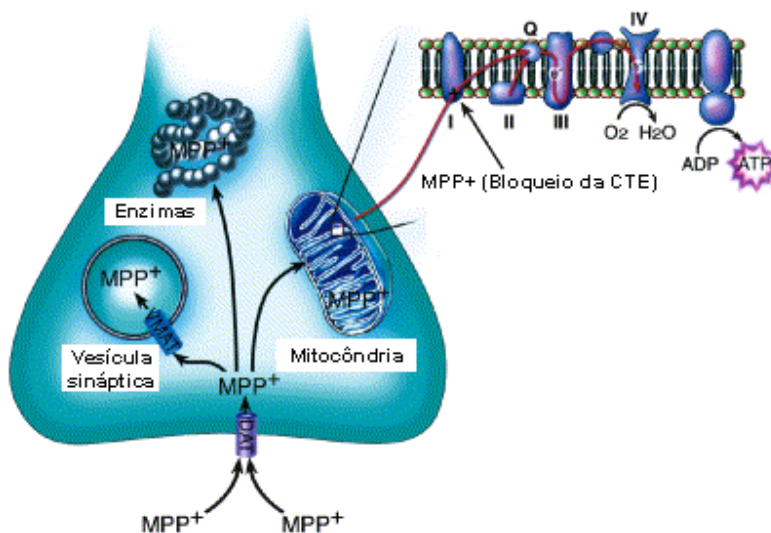
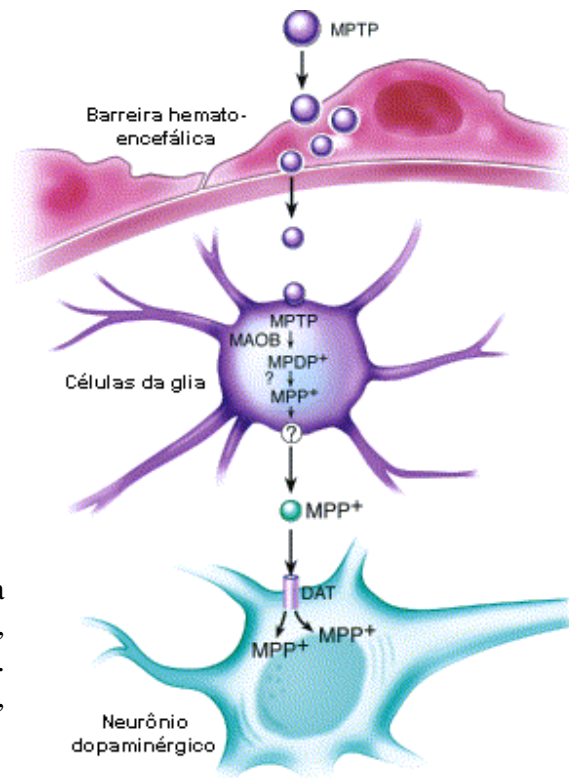


Figura 3: Representação esquemática das vias intracelulares do MPP⁺. CTE, cadeia transportadora de elétrons; DAT, transportador de dopamina; VMAT, transportador vesicular de monoaminas. Modificado de Dauer & Przedborski, (2003).

A toxicidade do MPTP em primatas é capaz de replicar todos os sinais clínicos da DP, incluindo tremor em repouso, rigidez muscular, bradicinesia e instabilidade postural. Esta toxina também causa perda de neurônios no *locus coeruleus*, um núcleo que também sofre neurodegeneração na DP. Outro fator importante deste modelo é a boa resposta apresentada ao tratamento com L-DOPA (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

A principal dificuldade com o modelo de DP induzido por MPTP é que o modo de administração da droga é agudo ou subagudo, enquanto que a DP é um processo progressivo lento que envolve vários anos (Beal, 2001; Shimohama *et al.*, 2003).

1.2.1.3. Rotenona

A rotenona é o mais potente composto da família dos rotenóides. É um composto lipofílico, de ocorrência natural no ambiente, que pode ser extraído de raízes de certas espécies de plantas para ser utilizado como pesticida ou para pesca por certas populações ribeirinhas. Atravessa facilmente a barreira hematoencefálica e atua como inibidor do complexo I da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. Possui certa notabilidade porque, apesar de agir uniformemente por todo SNC, pode produzir degeneração seletiva de neurônios nigroestriatais quando administrada de maneira crônica (Beal, 2001; Betarbet *et al.*, 2000; Perier *et al.*, 2003).

Ao contrário dos modelos induzidos por 6-OH-DA e por MPTP, o modelo de DP induzido por rotenona é claramente capaz de promover a morte de neurônios dopaminérgicos na SNpc em associação com a formação de corpos de Lewi. Em contrapartida, a severidade dos danos estriatais dopaminérgicos mostraram-se altamente

variáveis dentro de uma mesma linhagem de ratos (Betarbet *et al.*, 2000; Perier *et al.*, 2003).

Betarbet *et al.* (2000) produziram um modelo de DP com a infusão intravenosa crônica de rotenona através de cânulas ligadas a mini-bombas osmóticas inseridas na jugular de ratos da linhagem Lewis. Esse modo de administração foi escolhido devido à alta hidrofobicidade e insolubilidade da rotenona em solventes aquosos. Os ratos desenvolveram degeneração progressiva de neurônios nigrais, com diminuição da imunorreatividade contra tirosina hidroxilase, transportador de dopamina e transportador vesicular de monoaminas. Os neurônios nigrais remanescentes apresentaram inclusões citoplasmáticas com reatividade a anticorpos contra ubiquitina e α -sinucleína, apresentando à microscopia eletrônica formações densas circundadas por elementos fibrilares, similares aos corpos de Lewy. Além disso, os ratos mostraram bradicinesia, locomoção instável e alguma evidência de tremor, sendo que estes déficits melhoraram após tratamento com apomorfina, um agonista do receptor de dopamina. Entretanto, a patologia semelhante à DP só foi evidente em metade dos animais intoxicados com rotenona.

Muitos estudos têm demonstrado que os neurônios dopaminérgicos são mais suscetíveis a insultos ambientais e endógenos. Um dos fatores responsáveis por esta característica pode ser o fato de que esta população neuronal recebe aferências glutamatérgicas diretas de diferentes vias, como por exemplo, o núcleo subtalâmico e o tegmento pré-pontino. A atividade destas aferências glutamatérgicas resulta em ligeiro aumento na concentração intracelular de íons sódio (Na^+) nos neurônios dopaminérgicos da SNpc, requerendo maior atividade da enzima Na^+/K^+ ATPase e alto consumo de energia.

Isto leva ao aumento na atividade mitocondrial, com conseqüente geração de ERO, fazendo com que esta população neuronal seja mais suscetível a insultos ambientais ou endógenos. Um dos fatores que pode estar envolvido na toxicidade da rotenona à população dos neurônios dopaminérgicos é o fato de, após a inibição do complexo mitocondrial I, haver o aumento na produção de ERO e subseqüente depleção de ATP, o que pode aumentar ainda mais a suscetibilidade desta população de neurônios à rotenona (Alam & Schmidt, 2002; Betarbet *et al.*, 2000).

Em outro estudo realizado por Sherer *et al.* (2003), foi notada intensa ativação microglial no estriado e na SN nos animais tratados com rotenona, com menor ativação no córtex, anterior à perda neuronal dopaminérgica e mais evidente nos animais que apresentaram a lesão visível ao microscópio óptico, indicando um possível papel da resposta inflamatória na degeneração desta população neuronal. Além disso, também foi evidenciada limitada astrocitose reativa na área subjacente à lesão, resultados que não indicam a participação da astrocitose reativa na toxicidade da rotenona e que também estão de acordo aos achados em humanos (Mirza *et al.*, 2000).

Apesar da rotenona ser um composto lipofílico e ter a capacidade de atravessar membranas biológicas, a degeneração neuronal induzida por esta toxina parece ser seletiva para neurônios dopaminérgicos após tratamento crônico, ocorrendo preservação dos elementos pós-sinápticos no estriado, tanto no modelo de intoxicação utilizado por Betarbet *et al.* (2000) quanto no uso da via de administração subcutânea (Sherer *et al.*, 2003b). No entanto, contraditoriamente, outros estudos verificaram perda neuronal em diversas áreas do encéfalo e em diferentes populações neuronais (Höglinger *et al.*, 2003; Ferrante, *et al.*,

1997), além de diminuição nos níveis de dopamina no córtex pré-frontal (Alam & Schmidt, 2002).

Em outro estudo semelhante, Alam & Schmidt (2004) verificaram que os animais que apresentaram déficits motores após exposição à rotenona responderam positivamente ao tratamento com L-DOPA, mostrando melhora significativa com o tratamento, o que alimenta a controvérsia a respeito da seletividade do composto para neurônios dopaminérgicos e acerca do melhor modelo animal para o estudo dos mecanismos subjacentes à neurodegeneração na DP.

1.2.1.4. Paraquat

A administração do herbicida paraquat (N,N'-dimetil-4-4'-bipiridínio) também induz a um modelo tóxico de DP. Como notado na Figura 4, o paraquat possui similaridade estrutural com o MPP⁺, mas não atravessa facilmente a barreira hemato-encefálica. A toxicidade do paraquat parece estar relacionada com a formação de radicais superóxido (Day *et al.*, 1999). A administração sistêmica de paraquat em camundongos leva a degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNpc acompanhada por alteração na expressão e no metabolismo da proteína α -sinucleína, causando fibrilação, agregação e/ou aumento na imunorreatividade para esta proteína em diversas áreas do SNC, como mesencéfalo, SNpc e córtex frontal (Manning-Bog *et al.*, 2003, 2002; McCormack *et al.*, 2002). Não se sabe ao certo se a toxicidade deste composto é realmente seletiva para neurônios dopaminérgicos ou se outras populações de neurônios são similarmente afetadas.

A vantagem deste novo modelo é a capacidade de produzir perda neuronal dopaminérgica, além de inclusões positivas para α -sinucleína, de grande valor para o estudo do papel da α -sinucleína na neurodegeneração (Manning-Bog *et al.*, 2003).

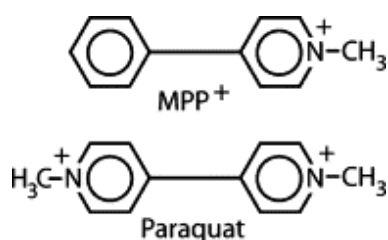


Figura 4: similaridade estrutural entre os compostos MPP⁺ e paraquat. Modificado de Dauer & Przedborski, 2003.

1.2.1.5. Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

Alguns autores sugerem que a degeneração de neurônios dopaminérgicos pode ser influenciada por reação glial concomitante. Herrera *et al.* (2000) demonstraram que uma simples injeção intranigral de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos promoveu lesão na SNpc, com diminuição na população de neurônios dopaminérgicos e com a preservação das populações de neurônios que utilizam GABA (ácido gama-aminobutírico) ou serotonina como neurotransmissor. Esta lesão foi acompanhada de reação inflamatória, sendo mais

proeminente na SN que no estriado, com intenso recrutamento de células mononucleares dos vasos sanguíneos para a SN.

Mais recentemente, os mesmos autores mostraram que a dexametasona, uma potente droga antiinflamatória, conferiu proteção contra a diminuição nos níveis de catecolaminas, além de reduções tanto na atividade quanto na imunomarcagem da enzima tirosina hidroxilase, após injeção de LPS (Castano *et al.*, 2002).

Em comparação ao LPS, a 6-OH-DA e o MPP⁺ são indutores de neurodegeneração muito mais potentes devido à alta atividade do sistema de captação de dopamina na SN, produzindo morte de neurônios diretamente pela produção de radicais livres ou inibição mitocondrial, respectivamente, enquanto que o LPS age indiretamente, via ativação microglial e liberação de produtos neurotóxicos (Herrera *et al.*, 2000).

O mecanismo pelo qual as células microgliais podem amplificar os danos celulares ainda não está claro. Entretanto, os fatores envolvidos nesses efeitos deletérios são muito provavelmente as citocinas, incluindo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α - do inglês *Tumor Necrosis Factor-alpha*), interleucina 1 beta (IL-1 β) e interferon gama (IFN- γ). Adicionalmente, foi observada uma densidade elevada de células gliais expressando TNF- α , IL-1 β e IFN- γ na SN de pacientes com a DP em relação a pacientes controle (Hartmann, 2003).

Dois mecanismos, não totalmente exclusivos, podem explicar o papel deletério das citocinas na DP. Primeiro, as citocinas pró-inflamatórias podem induzir a produção de óxido nítrico em células gliais e, assim, promover estresse oxidativo. O segundo

mecanismo é mais direto e ocorre pela ativação de receptores de TNF- α nos neurônios dopaminérgicos da SN, ativando vias apoptóticas (Boka *et al.*, 1994; Hartmann, 2003).

Este modelo tem como atrativo a possibilidade de explorar a participação de agentes pró-inflamatórios associados à patogênese da DP, bem como futuras estratégias terapêuticas com a utilização de agentes antiinflamatórios.

1.2.1.6. *Drosophila*

Os mecanismos de morte celular neuronal que acompanham doenças neurodegenerativas são bastante conservados desde os invertebrados até os humanos, o que tem levado ao desenvolvimento de modelos em organismos em que se possa proceder à dissecação da genética desses mecanismos, tirando vantagem da possibilidade de promover a expressão de mutações definidas em genes de invertebrados homólogos aos genes causadores de doenças em humanos.

Dentro dessa linha de raciocínio, Feany & Bender (2000) desenvolveram um modelo de DP no gênero *Drosophila*, a fim de demonstrar os efeitos causados por expressão transgênica de α -sinucleínas normais ou das formas mutantes associadas à DP em diferentes tipos celulares. Estes autores demonstraram que o aumento na expressão da forma normal de α -sinucleína em neurônios era capaz de reproduzir três aspectos chaves da DP: início tardio, depleção seletiva de neurônios dopaminérgicos e produção de agregados citoplasmáticos contendo α -sinucleína, semelhantes aos corpos de Lewy observados em humanos com DP. Além disso, a expressão das formas mutante e normal da α -sinucleína na retina resultou em neurodegeneração, o que sugere ser a toxicidade devido a esta proteína

uma característica não-exclusiva de neurônios dopaminérgicos. As moscas transgênicas também apresentaram déficits motores progressivos (perda precoce da capacidade de escalar). Espera-se que o desenvolvimento de um modelo confiável da DP, a mais comum desordem de movimento e a segunda doença neurodegenerativa mais comum venham a servir ao estudo da análise genética desta importante patologia.

1.2.1.7. Camundongos transgênicos

Camundongos que são desprovidos do gene da α -sinucleína são viáveis, férteis e mostram estrutura encefálica normal, sem déficits nas fibras, terminais e corpos celulares de neurônios dopaminérgicos. Não mostram evidências de fenótipo parkinsoniano, sugerindo que a perda da função da α -sinucleína não está relacionada a causa da DP, e que mutações no gene da α -sinucleína são mais provavelmente causadoras de DP pelo ganho de uma nova função (Beal, 2001; Dauer & Przedborski, 2003).

Camundongos que têm expressão aumentada de α -sinucleína desenvolvem progressiva acumulação de inclusões citoplasmáticas imunorreativas para α -sinucleína e ubiquitina em diversas áreas do SNC. Não foi verificada perda de neurônios dopaminérgicos na SN, mas houve perda de terminais nesta população de neurônios.

Esse modelo é desprovido de várias das principais características da DP, apesar de reproduzir alguns aspectos da demência com corpos de Lewy (Beal, 2001).

1.2.2. Modelos *in vitro* da doença de Parkinson

Os modelos experimentais *in vitro* são ótimas ferramentas para se estudar de forma mais minuciosa alguns achados observados em modelos *in vivo*. Além disso, modelos *in vitro* têm a vantagem de se poder diminuir ao máximo as variáveis presentes em certas situações *in vivo*, bem como de oferecer a oportunidade de se estudar mecanismos de ação envolvidos em certas perguntas experimentais.

Fatias de tecido mesencefálico, culturas de neurônios de mesencéfalo dissociados e linhagens de células derivadas de neurônios dopaminérgicos (e.g., células SH-SY5Y de humanos e PC12 de ratos) são adequadas para estudar detalhadamente mecanismos de degeneração neuronal dopaminérgica e novos agentes farmacológicos relacionados à DP (Kitamura *et al.*, 2000; Shimohama *et al.*, 2003).

Neurotoxinas clássicas como o MPP⁺ e a 6-OH-DA são inadequadas para administração sistêmica porque não atravessam a barreira hematoencefálica. Entretanto, sua captação para o interior de sinaptossomos no SNC é similar em primatas e roedores e, portanto, habilita-as a serem utilizadas em modelos *in vitro* (Kitamura *et al.*, 2000).

A administração de 6-OH-DA em culturas primárias mistas de mesencéfalo de rato resultou em acentuada diminuição na viabilidade celular, como avaliada pelo método do MTT (descrito na metodologia), bem como em indícios de peroxidação lipídica e aumento na produção de NO (Nobre Jr. *et al.*, 2003). Outros estudos mostraram que tanto o MPP⁺ quanto a 6-OH-DA reduzem a sobrevivência de neurônios dopaminérgicos em culturas primárias de mesencéfalo (Carrasco & Werner, 2002; Nobre Jr. *et al.*, 2003). Entretanto, os mecanismos celulares que levam à morte celular induzida por estas toxinas são distintos (Nobre Jr. *et al.*, 2003).

A neurotoxicidade induzida por glutamato proporciona um modelo farmacológico amplamente usado para se estudar estresse oxidativo. Utilizando este modelo, Sawada *et al.* (1996) mostraram que neurônios dopaminérgicos são mais resistentes ao óxido nítrico que neurônios não dopaminérgicos. Entretanto, após pré-tratamento com MPP+, a resistência ao óxido nítrico é diminuída e a neurotoxicidade devida ao glutamato é aumentada (Sawada *et al.*, 1996b).

Outra droga bastante utilizada em modelos *in vitro* é a toxina LPS, quando o objetivo do estudo é verificar o papel da resposta inflamatória em distúrbios neurodegenerativos. Em culturas de tecido nervoso, o LPS ativa células gliais e induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além de causar morte de neurônios dopaminérgicos em culturas mistas neurônio/glia, mas não em culturas neuronais semipuras (Bronstein *et al.*, 1995). Isso indica que a produção de fatores gliais induzidos por LPS, como citocinas, pode induzir morte neuronal, ao menos sob condições experimentais *in vitro*.

Le *et al.* (2001) mostraram que a administração de LPS em culturas primárias de mesencéfalo e culturas secundárias de células da linhagem dopaminérgica MES 23.5 promoveu ativação microglial, aumento na produção de citocinas como TNF- α e IL1- β , bem como de ERO, causando lesão celular nos dois tipos de culturas testados.

Outro fator importante observado no modelo de DP induzido por LPS é a seletividade neuronal. Diversos experimentos são relatados a seguir que demonstram efeitos diferenciais de compostos neurotóxicos quando utilizam-se populações neuronais distintas e diferentes composições de elementos da neuroglia nas preparações. Kim *et al.*

(2000), por exemplo, demonstraram que culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo, de hipocampo e de córtex cerebral apresentaram suscetibilidades diferentes quando expostas à mesma dose de LPS. Assim, as culturas feitas com tecido mesencefálico apresentaram maior sensibilidade à toxicidade do LPS, com redução da população neuronal dopaminérgica e outros neurônios, e aumento na produção de fatores inflamatórios. Em contraste, as culturas derivadas de hipocampo e córtex apresentaram resistência contra as doses potencialmente tóxicas para culturas de mesencéfalo. Estes autores creditaram esta maior suscetibilidade das culturas mesencefálicas ao maior número de células microglicais ativadas, em comparação às culturas derivadas de hipocampo e de tecido cortical.

Outro modelo *in vitro* de DP bastante utilizado para se estudar mecanismos de morte celular é o induzido por rotenona. Esta toxina tem se mostrado tóxica tanto em culturas primárias quanto para linhagens celulares imortalizadas. Sherer *et al.* (2002b) demonstraram que células de neuroblastoma humano expostas a doses crônicas de rotenona apresentaram agregação protéica e evidências de estresse oxidativo, bem como diminuição da glutatona e aumento de danos oxidativos em proteínas e DNA. Além disso, a rotenona mostrou-se muito mais tóxica para culturas primárias mistas de neurônios/glia que para culturas enriquecidas de neurônios de tecido mesencefálico (Gao *et al.*, 2002).

1.3. O PAPEL DOS ÍONS CÁLCIO (Ca^{2+}) NA NEURODEGENERAÇÃO DOPAMINÉRGICA

O cálcio ionizado (Ca^{2+}) é o elemento de transdução de sinal mais comum em células, ocorrendo desde bactérias até neurônios especializados. É, diferente de muitas outras moléculas de segundos mensageiros, paradoxalmente, essencial à vida, apesar de

concentrações intracelulares muito elevadas levarem à morte celular. O Ca^{2+} não pode ser metabolizado como outras moléculas de segundos mensageiros, razão pela qual as células necessitam regula com precisão seus níveis intracelulares com numerosas proteínas. Estas proteínas podem ser divididas em dois grupos: proteínas ligantes de Ca^{2+} e proteínas especializadas na extrusão do Ca^{2+} . Os níveis intracelulares normais atingem aproximadamente 100 nM, sendo muitas vezes menor que a concentração de 1 a 2 mM encontrada no meio extracelular. Grande quantidade de proteínas celulares tem sido adaptadas para se ligar fortemente ao Ca^{2+} , em alguns casos simplesmente para tamponar ou para diminuir os níveis de Ca^{2+} livre (Clapham, 1995; Saris & Carafoli, 2005).

Uma das vias envolvidas na sinalização do Ca^{2+} , exclusiva de células excitáveis, ocorre através dos canais de Ca^{2+} sensíveis à voltagem que, quando ativados, promovem um drástico aumento citosólico da concentração deste íon. Esta via é responsável por inúmeros eventos característicos desta classe de células, como contração muscular e exocitose de neurotransmissores, por exemplo. Vários tipos destes canais têm sido descritos na literatura, que diferem entre si pela sensibilidade a ativadores e inibidores, probabilidade e velocidade de abertura (Nestler *et al*, 2001).

O canal mais comum desta família é o do tipo L (do inglês “*large current* ou *long open time*”), ativados por grandes despolarizações (em torno de -20mV), com tempo de abertura relativamente longo antes de sua inativação (\cong 500 ms ou mais), e são bloqueados por diidropiridinas, como a nifedipina, por exemplo; os canais do tipo L estão localizados principalmente no corpo celular e dendritos proximais dos neurônios. Seu papel

ainda não está bem esclarecido, entretanto se admite que estejam envolvidos com ativação de segundos mensageiros e mudanças na transcrição gênica.

Os canais de Ca^{2+} do tipo T (do inglês *transient* ou *tiny current*) se abrem com potenciais de membrana mais negativos, próximos do potencial de repouso (-40mV); exibem inativação dependente de voltagem; acredita-se que, além de estarem envolvidos na regulação das concentrações de Ca^{2+} intracelulares, promovam uma corrente marcapasso nos neurônios talâmicos, gerando descargas corticais rítmicas associadas com crises de ausência (epilepsia).

Os canais do tipo N (do inglês *neuronal* ou *neither L nor T*) são ativados por grandes despolarizações; a ativação e inativação possuem cinética rápida (inativação em torno de 80ms); são mais conhecidos por sua regulação da liberação de neurotransmissores, principalmente em neurônios corticais.

Os canais do tipo P, primeiramente descritos nas células de Purkinje cerebelares, têm condutância similar aos canais do tipo N, porém com inativação lenta. Semelhante aos canais do tipo N, também estão envolvidos na liberação de neurotransmissores em alguns neurônios.

Os canais do tipo Q são ativados por grandes despolarizações e são rapidamente inativados. Estão localizados principalmente nas células granulares cerebelares, neurônios piramidais hipocâmpais e pituitária. Estão envolvidos na liberação de neurotransmissores.

O retículo endoplasmático age como uma rede para as proteínas ligantes de Ca^{2+} e seqüestra ativamente este íon para o espaço intraorganelar. Esta captação é feita pela ação das chamadas bombas de Ca^{2+} , que são proteínas transmembrana existentes no retículo endoplasmático e que utilizam ATP no bombeamento deste íon para dentro do retículo

endoplasmático, contra o gradiente de concentração. Dentro da organela, o Ca^{2+} é seqüestrado por altas concentrações de moléculas-tampões especializadas, como por exemplo, a calsequestrina, a calreticulina e a endoplasmina, que ainda não tem função conhecida, mas agem como moléculas armazenadoras de baixa afinidade e alta capacidade de captação (Clapham, 1995; Saris & Carafoli, 2005).

Além do retículo endoplasmático, as bombas de Ca^{2+} também podem ser encontradas na membrana celular, com o mesmo objetivo de promover a extrusão e manter os níveis intracelulares de Ca^{2+} baixos.

Outra organela que desempenha um papel chave em inúmeros processos celulares que ocorrem com gasto de energia é a mitocôndria. Entre estes processos, podemos citar a via de sinalização do Ca^{2+} (Ba *et al.*, 2004), que depende da produção de ATP para manter sua homeostase.

Para manter a homeostase do Ca^{2+} , a mitocôndria acumula este íon até uma concentração de 0,5 mM na sua matriz devido ao alto gradiente eletroquímico. Esta captação é feita pelo chamado uniporte mitocondrial seletivo ao Ca^{2+} , que tem menor afinidade que as bombas de Ca^{2+} e provavelmente são significantes apenas quando as concentrações citosólicas atingem níveis acima de $0,5\mu\text{M}$, de vez que a concentração de Ca^{2+} é baixa dentro da mitocôndria quando a célula está em repouso (Clapham, 1995; Saris & Carafoli, 2005).

Sendo assim, para que uma célula saudável mantenha todas as suas funções fisiológicas normais, há a necessidade de um refinado mecanismo de controle da homeostase do Ca^{2+} . No caso de haver, por qualquer motivo, quebra de continuidade neste

mecanismo, este íon tornar-se-á um agente potencialmente lesivo à célula, podendo levá-la à morte.

Neste contexto, Sherer *et al.* (2001) verificaram que a exposição crônica de células de neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y à rotenona resultou em respostas anormais no influxo de Ca^{2+} mediado por carbacol, um agonista não-seletivo de receptores da acetilcolina. Essas respostas anormais foram abolidas após administração de nifedipina, um inibidor de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, e vermelho de rutênio, um inibidor da captação de Ca^{2+} da mitocôndria. Estes resultados sugerem que um possível defeito na cadeia transportadora de elétrons, como uma redução crônica na sua atividade, pode alterar eventos de sinalização, promovendo a ativação mecanismos de morte celular em doenças neurodegenerativas.

Em outro modelo experimental, a administração de nifedipina, um bloqueador de canais de Ca^{2+} do tipo L, mas não de ω -conotoxina, cloreto de níquel (NiCl_2) e flunarizina, bloqueadores de canais de Ca^{2+} tipo T, reverteram a perda de viabilidade celular em linhagem de células SK-N-SH intoxicadas com proteína β -amilóide *in vitro*, sugerindo um possível papel do Ca^{2+} no mecanismo de toxicidade. Porém, nenhum dos bloqueadores investigados mostrou efeitos neuroprotetores contra a toxicidade do MPTP (Ba *et al.*, 2004).

O MPP+, quando administrado concomitantemente com 6-OH-DA ou dopamina, diminuiu significativamente a habilidade da mitocôndria de reter o Ca^{2+} endógeno. Desse modo, um distúrbio na homeostase do Ca^{2+} mitocondrial pode levar a ativação de vias de morte celular (Frei and Richter, 1986).

Assim, é possível que o íon Ca^{2+} exerça algum papel na neurotoxicidade induzida por rotenona. Dessa maneira, foram utilizadas três drogas que alteram a homeostase do Ca^{2+} com o objetivo de verificar possíveis influências nos mecanismos de toxicidade da rotenona.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Padronizar um modelo *in vitro* da DP com utilização da rotenona em culturas primárias de diferentes populações de neurônios e gliócitos, para investigação da influência das vias de sinalização dependentes dos íons Ca^{2+} no mecanismo de toxicidade.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mensurar a influência da exposição à diferentes concentrações de rotenona (10, 20 e 30 nM) sobre a viabilidade de culturas primárias de neurônios de ratos da linhagem Wistar;
- Comparar experimentos com culturas de populações neuronais do hipocampo e do mesencéfalo ventral de ratos neonatos com o objetivo de avaliar possíveis diferenças regionais de vulnerabilidade;
- Avaliar a influência do tempo de exposição (7 e 14 dias) sobre o efeito neurotóxico da rotenona em culturas derivadas de mesencéfalo ventral;
- Investigar o envolvimento de diferentes vias dependentes de íons Ca^{2+} no mecanismo de neurotoxicidade da rotenona;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados ratos neonatos da linhagem Wistar com até quatro dias de idade, entre PND2 e PND4, provenientes do Biotério do Centro de Ciências Biológicas da UFPA. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas no guia Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação, da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP.

3.2. CULTURAS PRIMÁRIAS DE NEURÔNIOS

Os animais utilizados nos experimentos foram sacrificados por decapitação abrupta, realizada fora da cabine de fluxo laminar sobre uma placa de petri contendo etanol 70%. Após a decapitação, foi realizada a dissecação do encéfalo, feita dentro da cabine, sobre uma placa de petri com meio de dissecação estéril (anexo 1). Em seguida, o encéfalo foi manipulado em uma outra placa com meio de dissecação novo, a fim de se minimizar os riscos de contaminação. O hipocampo ou mesencéfalo ventral, livres de meninges, foram microdissecados em meio de dissecação estéril (Smeyne & Smeyne, 2002). As regiões neuronais isoladas foram então incubadas por cerca de 5 a 10 minutos a 37 °C em solução de tripsina-EDTA a 0,05% (Invitrogen) em solução livre de cálcio e magnésio (CMF – do inglês *calcium magnesium free*) (anexo 2) para digestão enzimática, e depois transferidas para meio de cultura Neurobasal A (NBA, Invitrogen) contendo soro bovino fetal (FBS – do inglês *fetal bovine serum*) a 10% e triturados mecanicamente de maneira suave com o

auxílio de pipeta Pasteur. O processo de trituração foi repetido com outra pipeta Pasteur flambada até metade de seu diâmetro de ponta original. As células contidas no sobrenadante foram então plaqueadas a uma densidade aproximada de 5×10^5 células/poço em 2 ml de meio de cultura, em placas de cultura multipoços cobertas com poli-L-lisina e mantidas a 37°C com 5% CO₂ em atmosfera umidificada na incubadora (Costa *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2002).

3.3. CULTURAS SEMIPURAS DE NEURÔNIOS

As células foram inicialmente plaqueadas em 2 ml de meio NBA suplementado com 10% de FBS, 25 µM de glutamato, 100 unidades/ml de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAXTM-1 (L-alanil-L-glutamina) e 0,25 mM de L-glutamina. Após 24 horas, o FBS foi substituído por suplemento B27 (Invitrogen), um inibidor de crescimento glial e, após 5 dias em cultura, o glutamato foi removido do meio. Foram realizadas trocas regulares do meio de cultura a cada 5 dias (Costa *et al.*, 2000).

Para o tratamento com rotenona, as culturas foram mantidas em meio NBA suplementado com B27, 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAXTM-1 e 0,25 mM de L-glutamina (Costa *et al.*, 2000).

3.4. CULTURAS MISTAS DE NEURÔNIOS/GLIA

As células foram inicialmente plaqueadas em 1 ml de meio NBA suplementado com 10% de FBS, 10 % de soro de cavalo (HS – do inglês *horse serum*), 25 µM de glutamato, 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/ml de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAXTM-1 e 0,25 mM de L-glutamina. Após 3 dias, foi adicionado mais 0,5 ml de

meio de cultura. Foram realizadas trocas regulares do meio de cultura a cada cinco dias (Gao *et al.*, 2002).

Para o tratamento com rotenona, as culturas foram mantidas em meio NBA suplementado com 2 % de FBS, 2 % HS, 100 unidades/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina, 1 mM de GlutaMAXTM-1 e 0,25 mM de L-glutamina (Gao *et al.*, 2002).

3.5. IMUNOCITOQUÍMICA

Para caracterização fenotípica das culturas, as células foram plaqueadas em poços contendo uma lamínula de 13 mm de diâmetro cobertas com poli-L-lisina, onde foi feita imunocitoquímica de acordo com o protocolo descrito por Liu *et al.* (2000).

Os neurônios dopaminérgicos foram marcados com o anticorpo contra a enzima tirosina hidroxilase (anti-TH), enzima passo-limitante na produção de dopamina. A microglia foi visualizada pela marcação do receptor do complemento tipo 3 (CR3) com o anticorpo OX-42, e os astrócitos foram marcados contra a proteína acídica fibrilar glial, uma proteína do filamento intermediário restrita aos astrócitos, com o anticorpo anti-GFAP. Todos os anticorpos foram produzidos em camundongo.

Ao sétimo dia de cultura, as placas foram lavadas em PBS e fixadas com formaldeído 3,7% em PBS em por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as culturas foram então lavadas novamente e incubadas por 12 horas a 4°C em anticorpo primário diluídos em PBS com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de jumento, nas seguintes titulações: anti-TH, 1:1.000; OX-42, 1:1.000; anti-GFAP, 1:2.000.

Após incubação com o anticorpo primário, as células foram lavadas três vezes por 10 minutos em PBS e, em seguida, incubadas por 2 horas em PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e o anticorpo secundário biotilado feito em jumento na titulação de 1:200.

Após três lavagens, as culturas foram incubadas por 1 hora com os reagentes Vectastain ABC diluídos de acordo com a sugestão do fabricante em PBS.

A visualização do complexo formado foi feita através da incubação das culturas com peróxido de hidrogênio e DAB (3,3'-diaminobenzidina) em PBS.

O término da reação foi feito com lavagem das culturas em PBS.

As culturas foram então montadas em lâminas e cobertas com meio de montagem (Permount) e lamínula.

A captura de imagens será feita em microscópio NIKON Labophot 2.

3.6. TRATAMENTO COM ROTENONA

O tratamento foi feito a partir do sétimo dia de cultura com a exposição ao neurotóxico. A solução de rotenona foi preparada a partir da diluição da droga em DMSO (dimetilsulfóxido), com concentrações finais de 10, 20 ou 30nM, escolhidas segundo experimentos *in vitro* já descritos na literatura com a utilização de preparações similares (Gao *et al*, 2002; Sherer *et al.*, 2002). A cada reposição de meio de cultura, foi desprezado o meio de cultura anterior e colocado meio fresco com a solução de rotenona adicionada. O tratamento com rotenona teve duração de uma ou duas semanas, com o objetivo de construir uma curva temporal de resposta à toxicidade do composto.

3.7. O PAPEL DOS ÍONS Ca^{2+} NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA

Com o objetivo de analisar se o Ca^{2+} está envolvido no mecanismo de toxicidade da rotenona foram administradas, concomitantemente à rotenona, drogas que agem nesta via de sinalização.

A fim de verificar se o Ca^{2+} exógeno tem algum papel no mecanismo de toxicidade da rotenona, as culturas foram tratadas com 100 μM de EDTA, um quelante de Ca^{2+} extracelular (Sherer *et al.*, 2001).

Com o objetivo de verificar um possível papel do influxo de Ca^{2+} através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L na toxicidade induzida por rotenona, foi administrado 100nM de nifedipina, um inibidor deste tipo de canal (Sherer *et al.*, 2001).

Para avaliar se a captação de Ca^{2+} pela mitocôndria tem algum papel na toxicidade da rotenona, utilizamos o inibidor da captação de cálcio mitocondrial vermelho de rutênio em concentrações de 1 e 5 μM (Düzenli *et al.*, 2005).

A fim de se estudar o papel do Ca^{2+} microsomal na toxicidade da rotenona, utilizamos o inibidor da bomba de cálcio microsomal tapsigargina em concentração de 1 e 5 μM (Salter & Hicks, 1994).

3.8. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

Os ensaios de proliferação e viabilidade celular são de extrema importância para diversas aplicações de rotina em biologia celular. Os sais de tetrazolium (*e.g.*, MTT, XTT, NBT) são particularmente úteis neste tipo de análise. Estes sais são clivados até

compostos de formazan por enzimas desidrogenases, que pertencem à cadeia respiratória da mitocôndria, e estão ativas apenas em células metabolicamente intactas.

O ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium) foi utilizado neste trabalho como uma ferramenta para a determinação quantitativa de efeitos antiproliferativos ou citotóxicos mediados pela rotenona e para a medida da suposta interferência dos íons cálcio na toxicidade deste composto. O método é baseado na clivagem do sal de tetrazolium amarelado MTT em formazan, de coloração azul escura ou púrpura, por células metabolicamente ativas.

O sal de tetrazolium foi diluído em PBS em concentração de 5 mg/ml. A cada poço da placa de cultura foi adicionado 50 µL desta solução, sendo posteriormente incubada por 3 horas em condições normais de cultura. Os cristais de formazan do MTT foram então solubilizados em isopropanol e quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 570 nm.

Um aumento no número de células vivas resulta em aumento da atividade metabólica total, o que leva a formação de cor mais forte. Utilizando-se a absorbância média do controle negativo como 100%, será calculada a porcentagem de viabilidade de todas as amostras testes usando-se a absorbância média de cada amostra (Mosmann, 1983).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram descritos em média \pm EP (erro padrão médio).

A análise estatística foi realizada no programa Excel (Microsoft), com estatística descritiva de cada amostra, além da análise de variância (ANOVA) e o teste-t de

Student para se observar a diferença entre os grupos, onde foi adotado um valor para $P < 0,05$ como estatisticamente significativo.

4. RESULTADOS

4.1. COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS PRIMÁRIAS MISTAS E SEMIPURAS DE HIPOCAMPO E MESENCÉFALO VENTRAL.

A fim confirmarmos a capacidade de gerar, com a utilização de protocolos diversos, culturas primárias derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral com diferenças na composição de neurônios e glia, foram realizados experimentos de imunocitoquímica com anticorpos contra a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), contra o receptor tipo 3 do complemento (OX-42) e contra a enzima tirosina hidroxilase (TH), específicos para marcar astrócitos, microglia e neurônios catecolaminérgicos, respectivamente, que permitiram-nos denominar as culturas de mistas (neurônios/glia) e semipuras (maior percentual de neurônios). Em todos os casos, foi também realizada contra-coloração pelo método de Nissl (Figura 6). Nesse caso, o que nos interessava era demonstrar a ocorrência de menor percentual de células gliais em culturas semipuras do que em culturas mistas.

O padrão imunocitoquímico das culturas foi obtido através da porcentagem do número de células marcadas imunocitoquimicamente (GFAP, OX-42 ou TH) em relação ao número total de células, coradas pelo método de Nissl.

Assim, as culturas mistas derivadas de hipocampo apresentaram 14,57 %, 9,58 % e 10,38 % de células imunorreativas para GFAP, OX-42 e TH, respectivamente. No caso das culturas denominadas semipuras de neurônios derivadas de hipocampo, a imunorreatividade apresentou-se dividida em 11,41 %, 8,58 % e 13,51 % de células imunorreativas para GFAP, OX-42 e TH, respectivamente (Figura 5, Tabela 3).

As culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram 27,93 %, 22,49 % e 16,02 % de células imunorreativas para GFAP, OX-42 e TH, respectivamente. Nas culturas semipuras de neurônios derivadas de mesencéfalo ventral encontramos valores de 9,31 %, 8,86 % e 11,67 % de células imunorreativas para GFAP, OX-42 e TH, respectivamente (Figura 5, Tabela 3).

Tabela 3: Caracterização imunocitoquímica de culturas neuronais derivadas de hipocampo e mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do número total de células. MES, Mesencéfalo ventral; HIP, Hipocampo; M, Mistas; S, Semipuras.

	MES-M	MES-S	HIP-M	HIP-S
GFAP	27,93 ± 7,33	9,31 ± 7,44	14,57 ± 2,74	11,41 ± 4,69
OX-42	22,49 ± 5,00	8,86 ± 4,17	9,58 ± 1,97	8,58 ± 3,86
TH	16,02 ± 3,39	11,67 ± 4,21	10,38 ± 3,75	13,51 ± 7,24

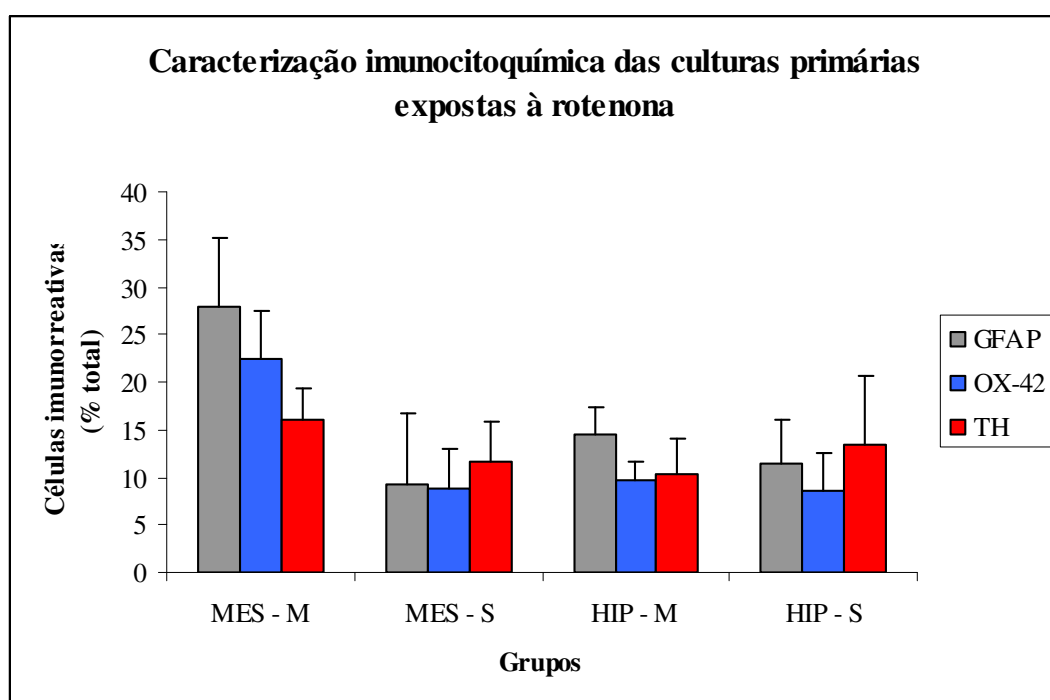


Figura 5: Caracterização imunocitoquímica das culturas primárias derivadas de mesencéfalo e hipocampo. MES, Mesencéfalo ventral; HIP, Hipocampo; M, Mistas; S, Semipuras. Resultados expressos em número de células imunorreativas (% total) \pm desvio padrão.

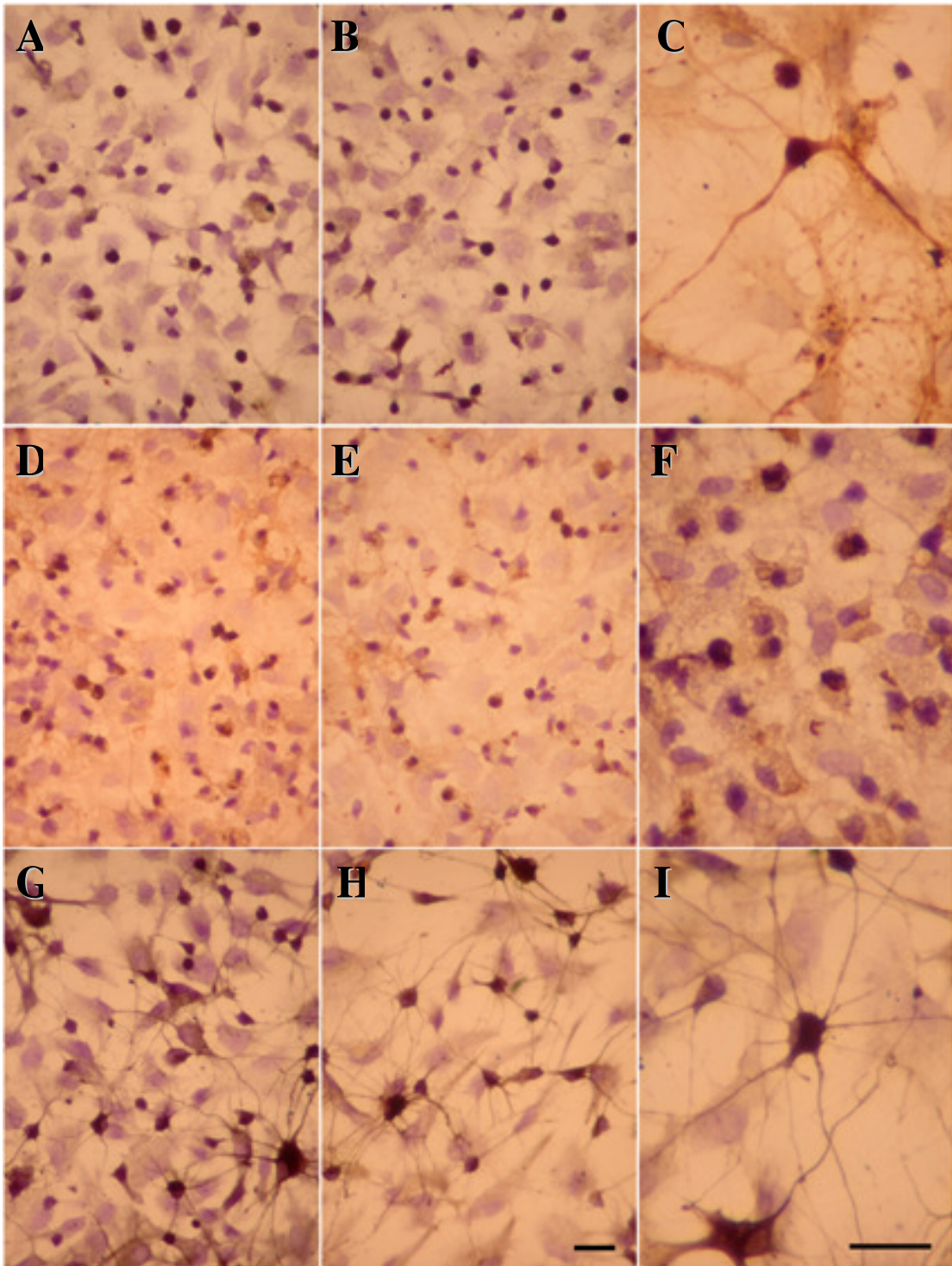


Figura 6: Figura representativa do padrão de marcação imunocitoquímica com anticorpos anti-TH (A, B, C), OX-42 (D, E, F) e anti-GFAP (G, H, I) e contra-coloração pelo método de Nissl. A marcação marrom representa imunocitoquímica revelada com DAB. Em violeta, ao fundo, coloração de Nissl. Escala = 50 μ m.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE DE CULTURAS NEURONAIS PRIMÁRIAS

Neste trabalho, foram utilizadas três concentrações de rotenona, 10, 20 e 30 nM, a fim de se verificar efeito dependente de dose deste composto sobre as células em cultura. As culturas semipuras derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral apresentaram suscetibilidade à toxicidade da rotenona apenas nas doses de 20 e 30 nM, enquanto que as culturas mistas, hipocampais e mesencefálicas, mostraram diminuição na viabilidade celular nas três doses testadas, mostrando-se mais suscetíveis à toxicidade da rotenona.

O ensaio de viabilidade celular mostrou que as culturas semipuras derivadas de tecido hipocampal não apresentaram perda significativa de viabilidade celular quando expostas a 10 nM de rotenona por 7 dias. Nas doses de 20 e 30 nM este tipo de cultura apresentou valores de viabilidade celular de $49,43 \pm 7,64 \%$ e $32,77 \pm 4,42 \%$ em relação aos controles, respectivamente (Figura 7A; Tabela 4), enquanto que as culturas hipocampais mistas apresentaram viabilidade de $89,30 \pm 1,43 \%$, $86,88 \pm 0,96 \%$ e $66,12 \pm 0,30 \%$ quando tratadas com 10, 20 e 30 nM de rotenona, respectivamente (Figura 7B; Tabela 4).

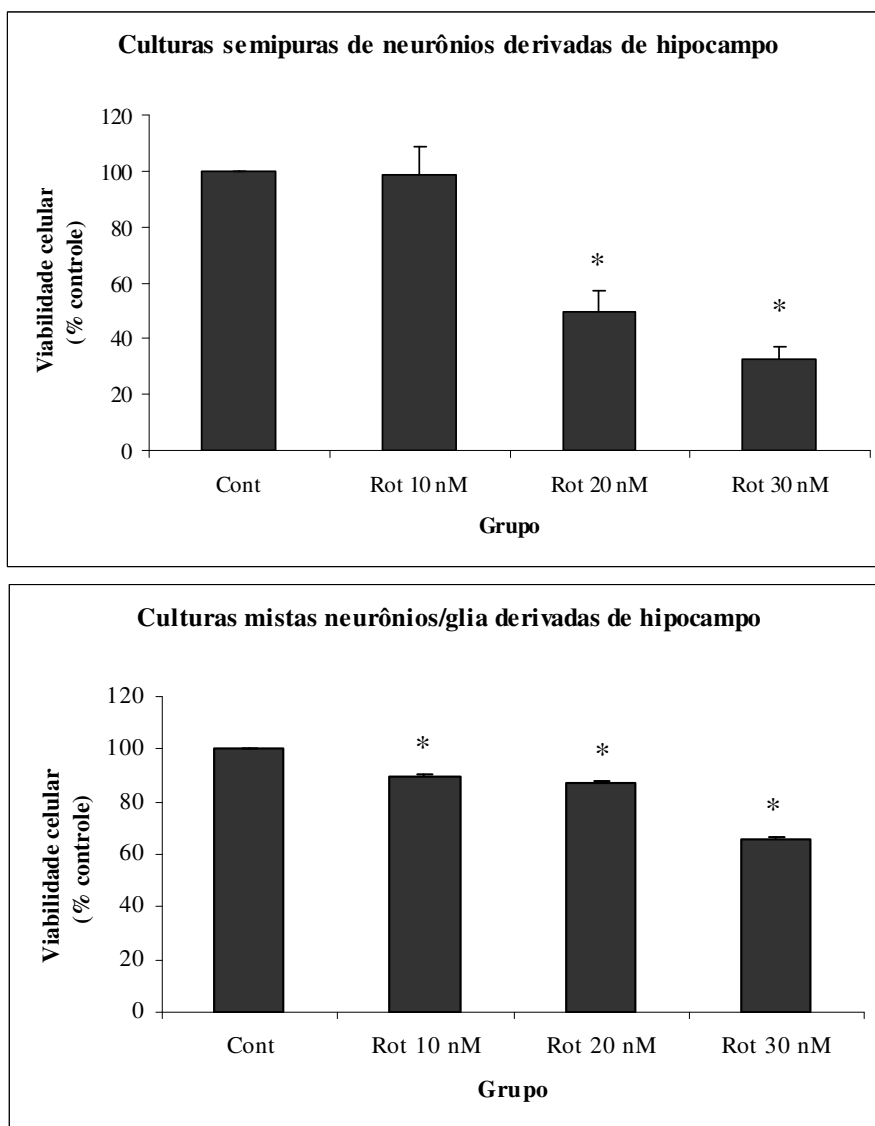


Figura 7: Efeito de diferentes concentrações de rotenona na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo. Valores expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle. Cont, Controle; Rot, Rotenona.

Tal como observado com as culturas semipuras de hipocampo, também as culturas semipuras de neurônios derivadas de mesencéfalo ventral não apresentaram perda significativa de viabilidade celular quando expostas a 10 nM de rotenona por sete dias. Nas doses de 20 e 30 nM, no entanto, este tipo de cultura apresentou viabilidade celular de $60,11 \pm 7,35 \%$ e $53,76 \pm 9,94 \%$ em relação ao controle, respectivamente (Figura 8A; Tabela 4), enquanto que as culturas mesencefálicas mistas apresentaram viabilidade de $77,94 \pm 9,29 \%$, $47,38 \pm 0,41 \%$ e $39,69 \pm 9,05 \%$ quando tratadas com 10, 20 e 30 nM de rotenona, respectivamente (Figura 8B; Tabela 4).

Como se pode denotar a partir dos números, os dados resultantes comprovaram o efeito neurotóxico da rotenona em ambas as populações e em ambos os protocolos de culturas testados. Chama a atenção, no entanto, o fato de que a maior suscetibilidade aos efeitos neurotóxicos da rotenona são observados em culturas mistas do mesencéfalo ventral, cuja composição celular apresenta as maiores porcentagens de células TH-positivas e de células da microglia, o que levanta interessantes possibilidades desta maior suscetibilidade estar relacionada a maior densidade de neurônios dopaminérgicos e de células imunes do sistema nervoso nesta condição experimental.

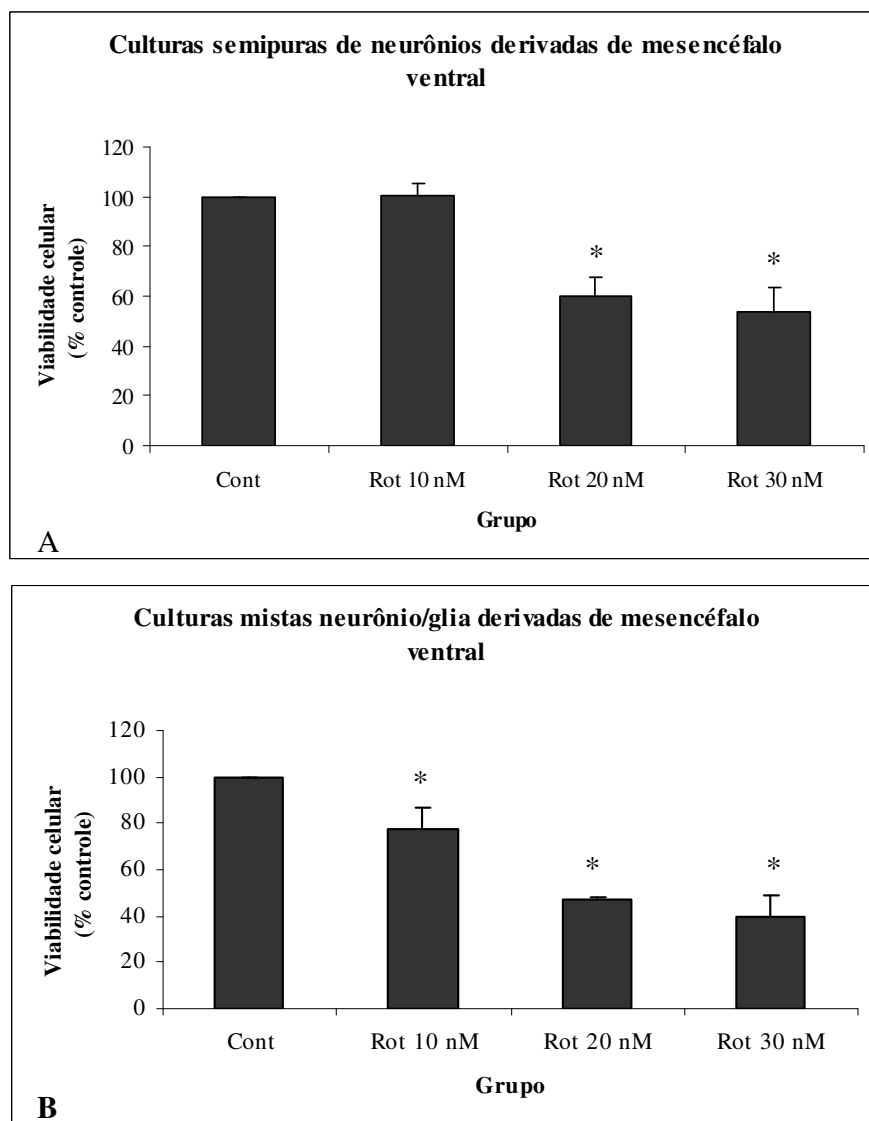


Figura 8: Efeito de diferentes concentrações de rotenona na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral. Valores expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle. Cont, Controle; Rot, Rotenona.

Tabela 4: Viabilidade celular dos diferentes tipos de cultura testados, expostos a 10, 20 e 30 nM de rotenona. HPC, Hipocampo; MES, Mesencéfalo; M, mistas neurônio/glia; S, semipuras de neurônios; Rot, Rotenona. Dados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão.

	Rot 10 nM	Rot 20 nM	Rot 30 nM
HPC – S	98,34 \pm 10,42	49,43 \pm 7,64	32,77 \pm 4,42
HPC – M	89,30 \pm 1,43	86,88 \pm 0,96	66,12 \pm 0,30
MÊS – S	100,28 \pm 4,86	60,11 \pm 7,35	53,76 \pm 9,94
MÊS – M	77,94 \pm 9,29	47,38 \pm 0,41	39,69 \pm 9,05

Além disso, nossos resultados mostraram que as culturas semipuras derivadas de hipocampo apresentaram maior suscetibilidade que as mesmas culturas derivadas de mesencéfalo ventral expostas a 30 nM de rotenona. Na menor concentração testada (20 nM), os resultados também mostram a mesma tendência, porém sem diferença estatisticamente significativa, enquanto que na concentração de 10 nM não houve diferença entre os testes de viabilidade celular (Figura 9A; Tabela 4).

Em relação às culturas mistas, as culturas derivadas de mesencéfalo ventral mostraram-se mais suscetíveis que as de hipocampo nas três doses testadas, porém a análise estatística mostrou diferença significativa apenas nas concentrações de 20 e 30 nM (Figura 9B; Tabela 4).

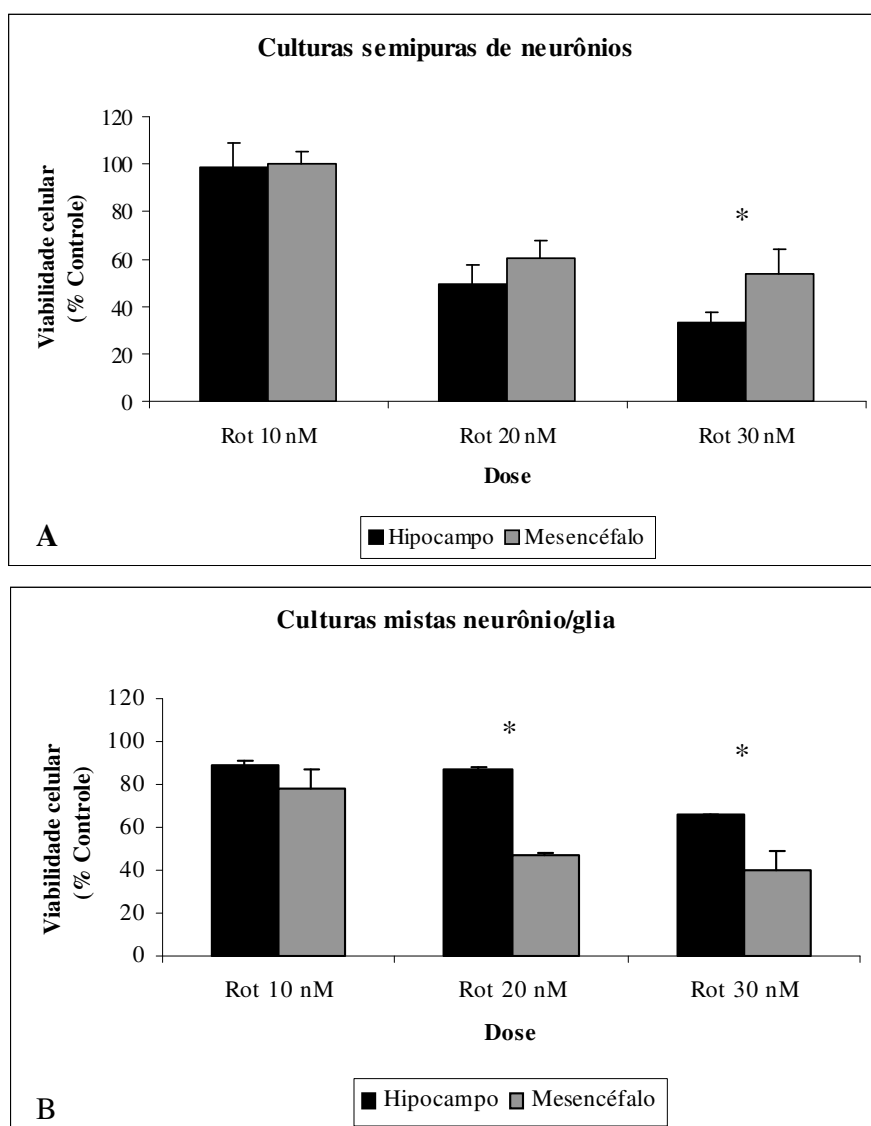


Figura 9: Diferenças regionais na vulnerabilidade celular à toxicidade da rotenona em culturas derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ em comparação intragrupo. Rot, Rotenona.

4.3. O EFEITO NEUROTÓXICO DA ROTENONA SOBRE NEURÔNIOS DO MESENCÉFALO VENTRAL NÃO PARECE SER INFLUENCIADO PELO TEMPO DE EXPOSIÇÃO.

Para verificar a influência do tempo de exposição à rotenona sobre a toxicidade deste composto, comparamos os resultados dos ensaios de viabilidade celular em culturas mesencefálicas ventrais expostas por sete e quatorze dias. Este protocolo de cultura foi escolhido por representar nosso principal alvo de investigação e por conter, como visto no parágrafo anterior, maior densidade de neurônios dopaminérgicos e de células da glia.

Os ensaios de viabilidade celular não mostraram efeito dependente de tempo nas culturas neuronais derivadas de mesencéfalo ventral, quer sejam semipuras ou mistas, para as três concentrações testadas (Tabela 5). O ensaio com MTT mostrou que as culturas semipuras de mesencéfalo ventral expostas por sete dias a rotenona apresentaram viabilidade celular de $100,28 \pm 4,86 \%$, $60,11 \pm 7,35 \%$ e $53,76 \pm 9,94 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com 10, 20 e 30 nM de rotenona, respectivamente. Enquanto que no tratamento por catorze dias foi obtida viabilidade celular de $96,18 \pm 4,11 \%$, $65,36 \pm 1,06 \%$ e $55,03 \pm 6,37 \%$ em relação ao controle, quando expostas a 10, 20 e 30 nM de rotenona, respectivamente (Figura 10A, Tabela 5).

Em relação às culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral, o tratamento por sete dias com rotenona apresentou viabilidade celular de $77,94 \pm 9,29 \%$, $47,38 \pm 0,91 \%$ e $39,69 \pm 9,05 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com 10, 20 e 30 nM de rotenona, respectivamente. No tratamento por catorze dias verificou-se viabilidade celular de $77,39 \pm 3,53 \%$, $41,73 \pm 0,66 \%$ e $32,55 \pm 3,25 \%$ em relação ao controle, quando expostas a 10, 20 e 30 nM de rotenona, respectivamente (Figura 10B, Tabela 5).

Nenhum dos resultados mostrou diferença estatisticamente significativa entre as culturas tratadas por sete dias em relação às tratadas por catorze dias.

Tabela 5. Viabilidade celular de culturas mesencefálicas semipuras (MES – S) e mistas neurônio/glia (MES – M) tratadas com rotenona por sete e catorze dias. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. Rot, Rotenona.

	Rot 10 nM		Rot 20 nM		Rot 30 nM	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
MES – S	100,28 \pm 4,86	96,18 \pm 4,11	60,11 \pm 7,35	65,36 \pm 1,06	53,76 \pm 9,94	55,03 \pm 6,37
MES – M	77,94 \pm 9,29	73,39 \pm 3,53	47,38 \pm 0,41	41,73 \pm 0,66	39,69 \pm 9,05	32,54 \pm 3,25

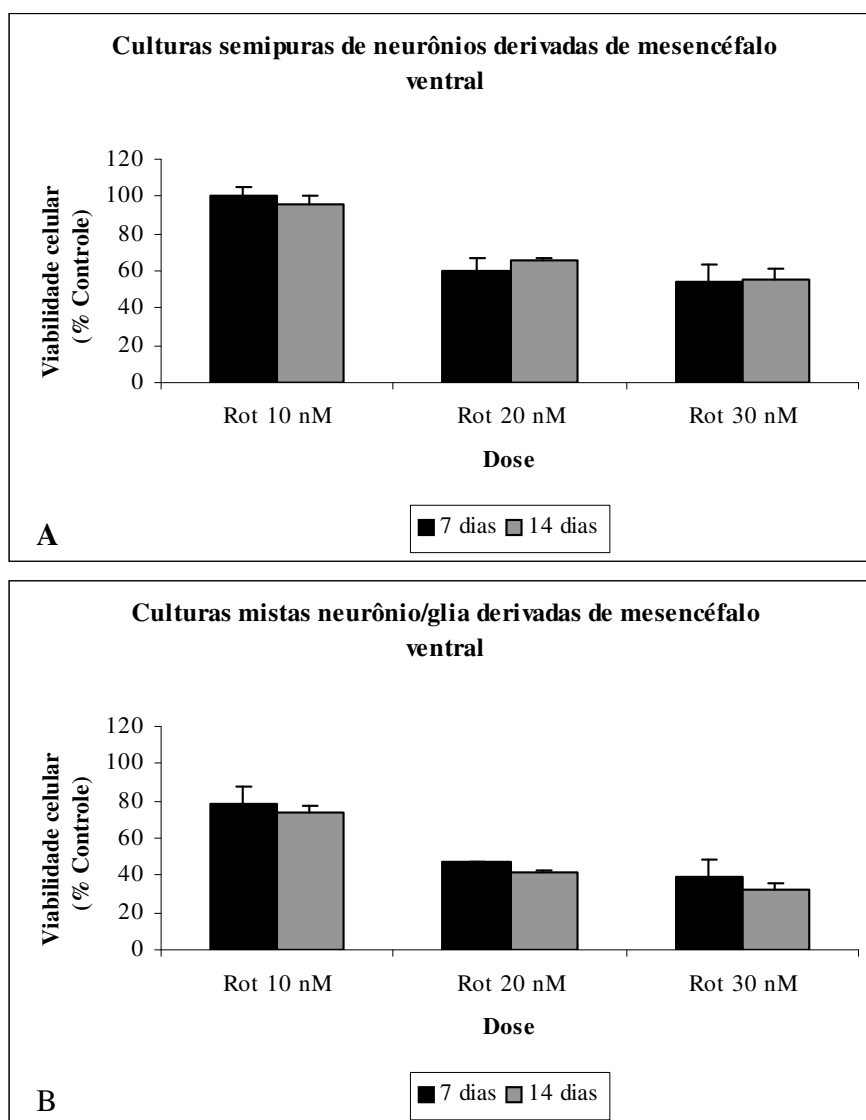


Figura 10: Efeito do tempo de exposição à rotenona em culturas derivadas de mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ em comparação intragrupo. Rot, Rotenona.

4.4. O PAPEL DOS ÍONS Ca^{2+} NA TOXICIDADE NEURONAL INDUZIDA POR ROTENONA.

O mecanismo mais plausível pelo qual a rotenona poderia causar efeitos semelhantes aos da doença de Parkinson em ratos é o de promover inibição do complexo mitocondrial I. Também é interessante o fato de que a utilização de rotenona em modelos animais foi capaz de desenvolver morte neuronal por apoptose, o que poderia contribuir para a etiologia da doença. Nakamura *et al.* (2004) demonstraram a ativação da via das caspases dependentes tanto de reservas mitocondriais como do retículo endoplasmático na apoptose induzida por rotenona, apesar de não terem conseguido determinar os mecanismos subjacentes a esta indução.

O mecanismo de apoptose consiste em um programa de morte celular altamente regulado induzido em células como uma estratégia suicida sob condições de crescimento desfavoráveis ou exposição a estímulos externos pró-apoptóticos. O processo de apoptose é regulado por sinais de superfície celular e pela expressão de proteínas celulares específicas. Os íons Ca^{2+} têm sido fortemente implicados na indução de apoptose e na regulação das vias de sinalização de apoptose. Negre-Salvayre & Salvayre (1992) demonstraram a dependência de íons Ca^{2+} tanto para apoptose como para os efeitos protetores de quelantes de Ca^{2+} e de bloqueadores de canais de Ca^{2+} . Durante apoptose, uma ampla variedade de agressões tóxicas, que culminam com a morte da célula, está associada com concentrações aumentadas de íons Ca^{2+} no meio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Negre-Salvayre & Salvayre, 1992; Nicotera & Orrenius, 1998). Os níveis de Ca^{2+} intracelular parecem ser um componente importante do mecanismo de apoptose, uma vez que a sinalização dependente de íons Ca^{2+} parece preceder certas vias que levam à apoptose. Elevações na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promovem ativação

de proteínas cinases dependentes de Ca^{2+} , assim como de fosfatases durante a apoptose (Bonney-Berard *et al.* (1994)). Também têm sido demonstrado que os íons Ca^{2+} agem em diversos pontos do ciclo celular, incluindo a reentrada de células quiescentes no processo de proliferação e na transição entre as fases G1/S, G2/M e metáfase/anáfase (Takuwa *et al.*, 1995).

Em outra série de experimentos, Wang & Xu (2005) demonstraram ser essencial a via de sinalização dependente de íons Ca^{2+} para indução de apoptose em células de neuroblastoma humano. A exposição à rotenona resultou em aumento na $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tal como demonstrado com a utilização de indicadores fluorescentes de cálcio. Em acordo com este achado inicial, a utilização de quelantes intracelulares de Ca^{2+} atenuaram os efeitos induzidos por rotenona, ao mesmo tempo em que também impediu eventos relacionados à apoptose, tais como a geração de espécies reativas de oxigênio, ativação de caspases e interrupção do ciclo celular em G2/M. Nestes experimentos a ausência de Ca^{2+} extracelular ou a utilização de bloqueadores de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem reduziu a elevação na $[\text{Ca}^{2+}]_i$ induzida por rotenona.

Uma vez que a elevação excessiva nos níveis de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ é um fator preponderante na indução de apoptose em muitos tipos celulares, os experimentos descritos a seguir foram realizados a fim de testar o papel da sinalização por Ca^{2+} na neurodegeneração induzida por rotenona em culturas primárias de hipocampo e mesencéfalo ventral.

4.4.1. O papel do Ca^{2+} extracelular na toxicidade induzida por rotenona em um modelo *in vitro* de DP.

Inicialmente, com o objetivo de verificar a influência do Ca^{2+} presente no meio extracelular sobre a toxicidade induzida por rotenona neste modelo *in vitro* de DP, utilizamos a nifedipina e o EDTA, um bloqueador de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L e um quelante de Ca^{2+} extracelular, respectivamente, adicionados ao meio de cultura segundo os protocolos já descritos anteriormente. Nestes experimentos, foi utilizada a concentração de 20 nM de rotenona durante sete dias. A escolha desta concentração se deveu ao fato de ter resultado em efeito neurotóxico para todos os tipos de cultura testados. As concentrações de nifedipina e EDTA utilizadas nestes experimentos foram escolhidas de acordo com dados já mencionados na literatura (Sherer *et al.*, 2001). As culturas foram divididas em quatro grupos: grupo controle, grupo tratado com 20 nM de rotenona, grupo tratado com 20 nM de rotenona + 100 nM de nifedipina, e grupo tratado com 20 nM de rotenona + 0,1mM de EDTA.

Os resultados dos testes de viabilidade mostraram pouca influência do Ca^{2+} externo na neurotoxicidade induzida por rotenona em culturas derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, mistas ou semipuras. Tanto nas culturas semipuras quanto nas mistas o EDTA mostrou um discreto aumento, estatisticamente significativo, na toxicidade induzida por rotenona, enquanto que a adição de nifedipina resultou em leve redução na toxicidade da rotenona nas culturas mistas, estatisticamente significativas (Figuras 11 e 12; Tabela 6).

O ensaio de viabilidade celular mostrou que as culturas semipuras derivadas de tecido hipocampal apresentaram viabilidade celular de $56,66 \pm 0,65 \%$, $56,07 \pm 1,35 \%$ e

49,99 ± 4,47 % em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + nifedipina e rotenona + EDTA, respectivamente (Figura 11A; Tabela 6). As culturas mistas derivadas de tecido hipocampal apresentaram viabilidade celular de 86,90 ± 1,29 %, 91,40 ± 2,21 % e 76,65 ± 6,85 % em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + nifedipina e rotenona + EDTA, respectivamente (Figura 11B; Tabela 6).

Os experimentos com culturas semipuras derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade celular de 67,10 ± 0,49 %, 63,84 ± 1,33 % e 60,74 ± 2,35 % em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + nifedipina e rotenona + EDTA, respectivamente (Figura 12A; Tabela 6). As culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade celular de 47,38 ± 0,41 %, 53,50 ± 2,57 % e 43,01 ± 1,64 % em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + nifedipina e rotenona + EDTA, respectivamente (Figura 12B; Tabela 6). Nossos dados sugerem que o pré-tratamento com rotenona pouco depende de íons Ca^{2+} provenientes do meio extracelular, como depreendido pela utilização de quelante extracelular ou de bloqueador de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, pelo menos para a concentração testada nestes experimentos.

Tabela 6: A influência do Ca^{2+} extracelular na viabilidade celular em cultura de células expostas à rotenona. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. HPC , Hipocampo; MES, Mesencéfalo ventral; S, Semipura de neurônio; M, Mista neurônio/glia; Rot, Rotenona; Nif, Nifedipina.

	Rot 20 nM	Nif 100 nM	EDTA 0,1 mM
HPC – S	56,66 \pm 0,65	56,07 \pm 1,35	49,99 \pm 4,47
HPC – M	86,90 \pm 1,29	91,40 \pm 2,21	76,65 \pm 6,85
MES – S	67,10 \pm 0,49	63,84 \pm 1,33	60,74 \pm 2,35
MES – M	47,38 \pm 0,41	53,50 \pm 2,57	43,01 \pm 1,64

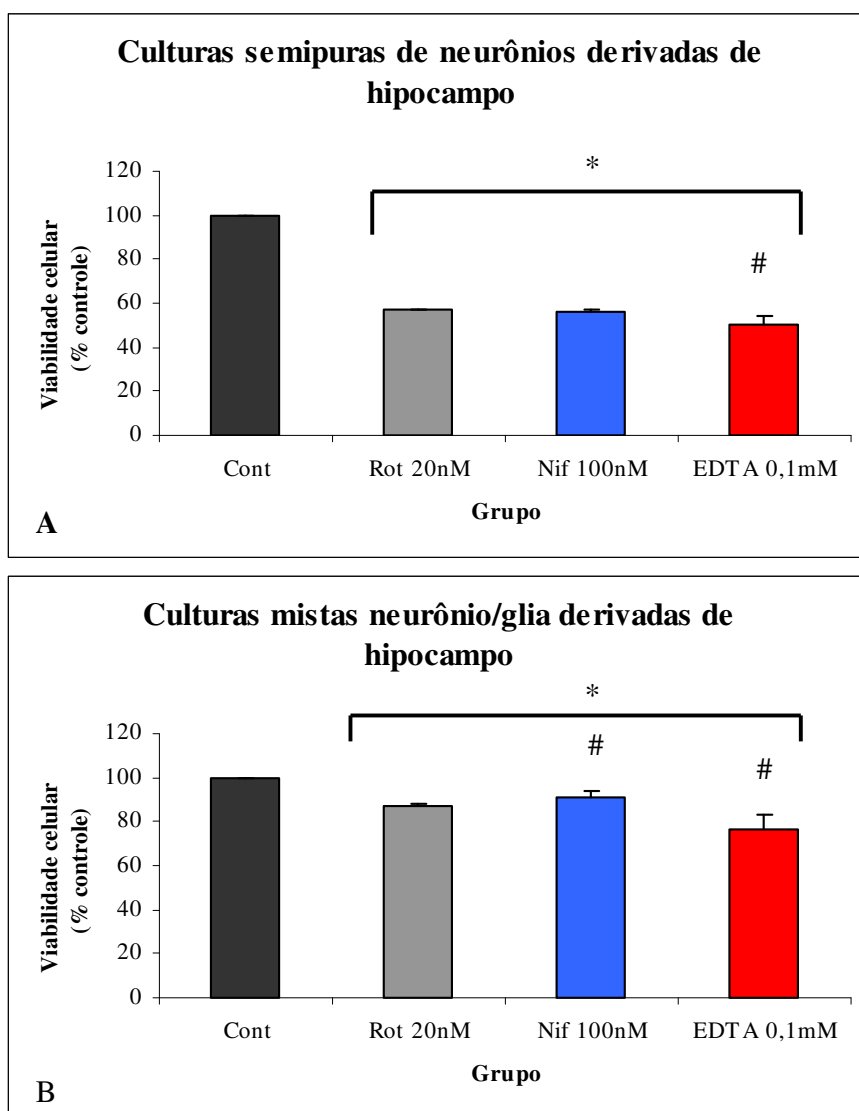


Figura 11: Influência do Ca^{2+} extracelular na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle; (#) $p < 0,05$ comparados ao grupo Rot 20 nM. Cont, Controle; Rot, Rotenona; Nif, Nifedipina.

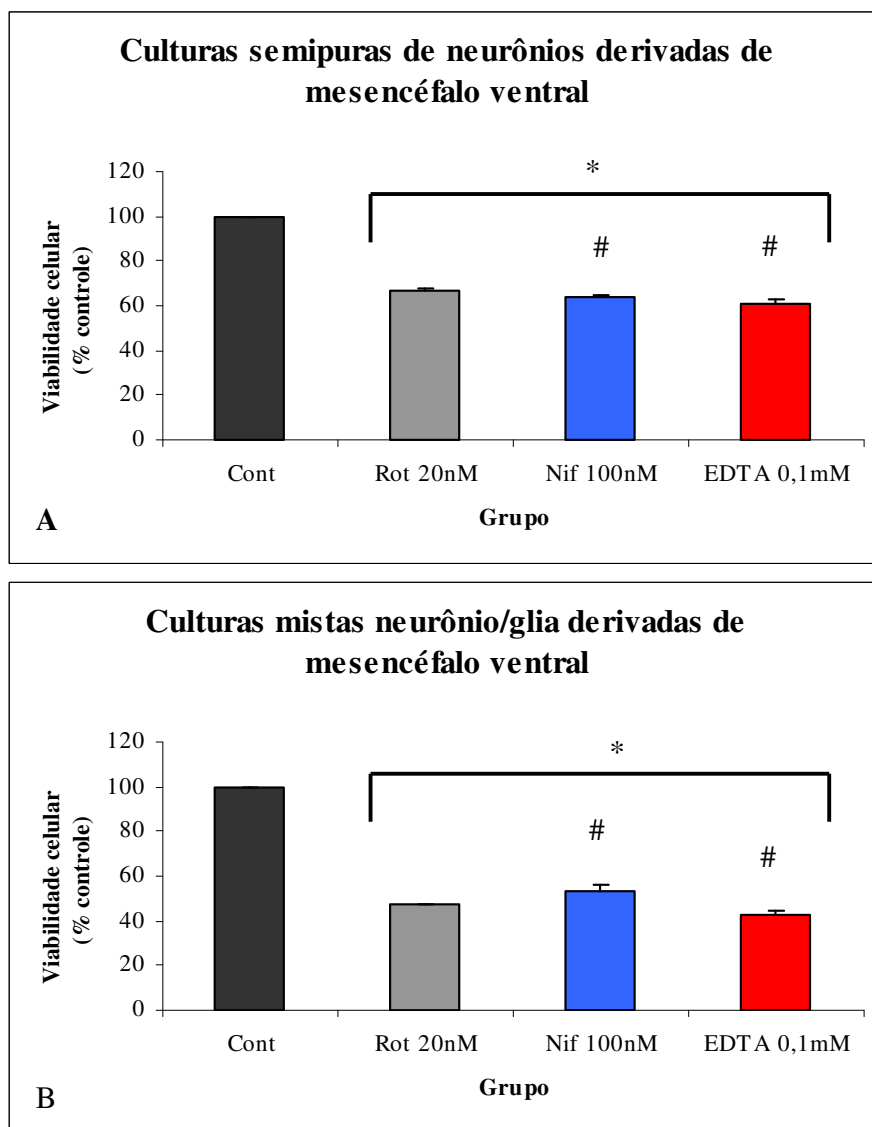


Figura 12: Influência do Ca^{2+} extracelular na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle; (#) $p < 0,05$ comparados ao grupo Rot 20 nM. Cont, Controle; Rot, Rotenona; Nif, Nifedipina.

4.4.2. O papel do Ca^{2+} microsomal na toxicidade induzida por rotenona.

Uma vez que a pré-exposição a rotenona pareceu não resultar em grande influxo de íons Ca^{2+} do meio extracelular através de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem, resolvemos investigar se as reservas de Ca^{2+} microsomal poderiam exercer alguma influência na toxicidade induzida por rotenona neste modelo *in vitro* de DP. Assim, em experimentos subsequentes utilizamos a tapsigargina, um bloqueador da ATPase dependente de Ca^{2+} (“Bomba” de Ca^{2+}) do retículo endoplasmático. Nestes experimentos, o tratamento foi feito com a concentração de 20 nM de rotenona durante sete dias. As concentrações de tapsigargina utilizadas nestes experimentos foram escolhidas de acordo com outros experimentos *in vitro* já realizados (Salter & Hicks, 1994). As culturas foram divididas em quatro grupos: grupo controle, grupo tratado com 20 nM de rotenona, grupo tratado com 20 nM de rotenona + 1 μM de tapsigargina, e grupo tratado com 20 nM de rotenona + 5 μM de tapsigargina.

Nossos resultados sugerem que a bomba de Ca^{2+} microsomal exerce influência na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, tanto nas de composição mista quanto nas semipuras. Uma vez que sob nossas condições experimentais os efeitos deletérios da rotenona sobre a viabilidade celular não pareceram depender do influxo de íons Ca^{2+} do meio extracelular, parece razoável imaginar que estes resultados adicionais estão de acordo com o esperado, uma vez que a bomba de Ca^{2+} é bastante importante para a manutenção da homeostase intracelular deste íon.

Nos quatro tipos de culturas testados, a tapsigargina aumentou a suscetibilidade à toxicidade da rotenona, ocorrendo redução da viabilidade celular nas duas concentrações

utilizadas. Além disso, as culturas semipuras de neurônios, derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, sofreram redução total na viabilidade celular (Figuras 13 e 14; Tabela 7).

O ensaio de viabilidade celular mostrou que as culturas semipuras derivadas de tecido hipocampal apresentaram viabilidade celular de $52,24 \pm 0,31 \%$, $38,56 \pm 0,26 \%$ e $2,25 \pm 0,10 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + $1 \mu\text{M}$ de tapsigargina e rotenona + $5 \mu\text{M}$ de tapsigargina, respectivamente (Figura 13A; Tabela 7). As culturas mistas derivadas de tecido hipocampal apresentaram viabilidade celular de $80,76 \pm 0,43 \%$, $61,55 \pm 3,00 \%$ e $50,18 \pm 0,14 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + $1 \mu\text{M}$ de tapsigargina e rotenona + $5 \mu\text{M}$ de tapsigargina, respectivamente (Figura 13B; Tabela 7).

Os experimentos com culturas semipuras derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade celular de $64,70 \pm 0,16 \%$, $28,65 \pm 0,80 \%$ e $2,82 \pm 0,27 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + $1 \mu\text{M}$ de tapsigargina e rotenona + $5 \mu\text{M}$ de tapsigargina, respectivamente (Figura 14A; Tabela 7). As culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade celular de $51,47 \pm 3,78 \%$, $35,67 \pm 0,30 \%$ e $37,05 \pm 0,36 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + $1 \mu\text{M}$ de tapsigargina e rotenona + $5 \mu\text{M}$ de tapsigargina, respectivamente (Figura 14B; Tabela 7).

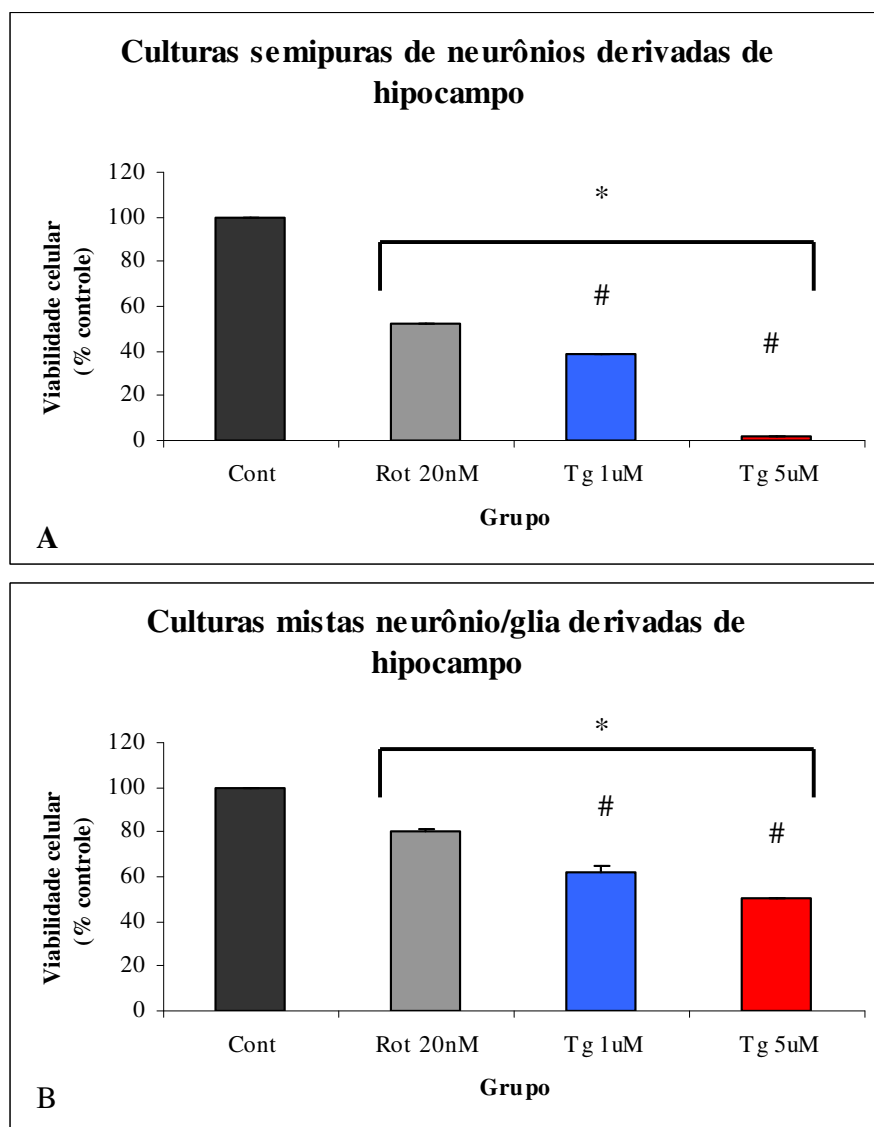


Figura 13: Influência do Ca^{2+} microsomal na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo Rot 20 nM. Cont, Controle; Rot, Rotenona; Tg, Tapsigargina.

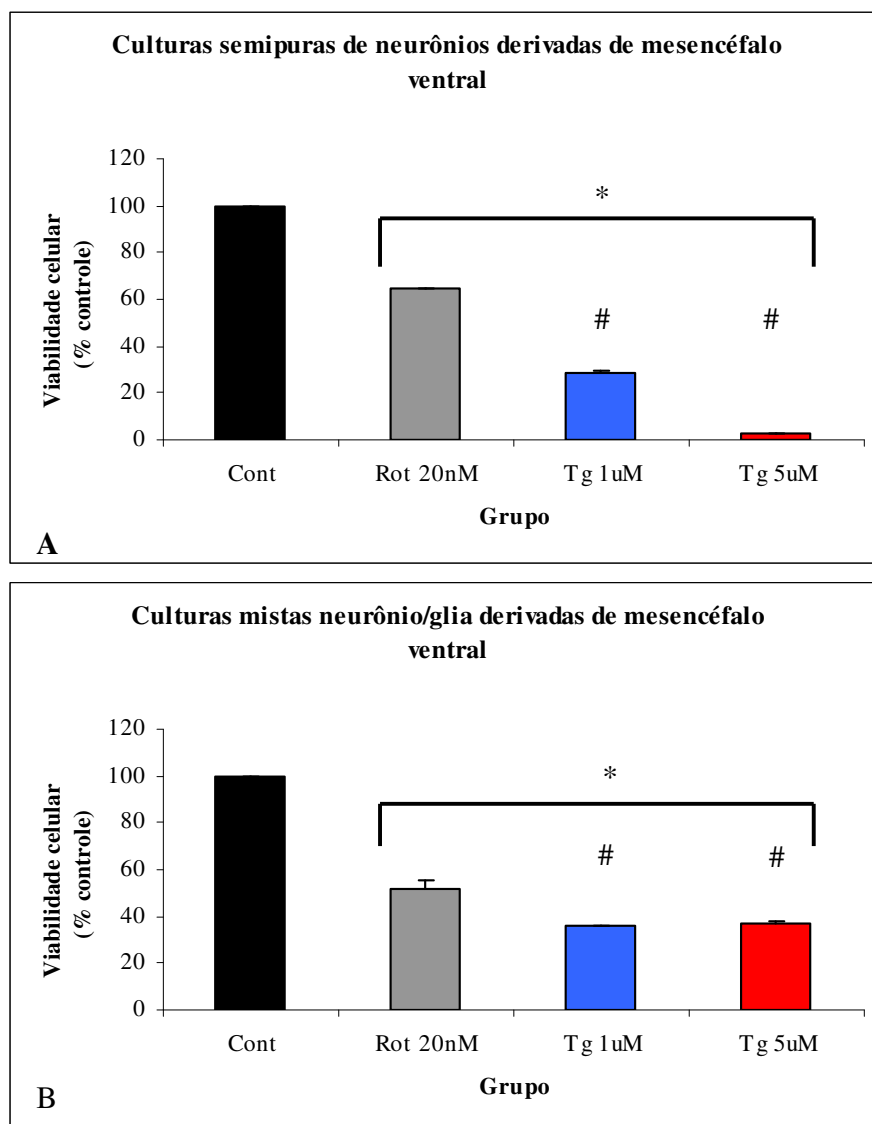


Figura 14: Influência do Ca^{2+} microsomal na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo Rot 20 nM. Cont, Controle; Rot, Rotenona; Tg, Tapsigargina.

Tabela 7: A influência do Ca^{2+} microsomal na viabilidade celular em cultura de células expostas à rotenona. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. HPC , Hipocampo; MES, Mesencéfalo ventral; S, Semipura de neurônio; M, Mista neurônio/glia; Rot, Rotenona; Tg, Tapsigargina.

	Rot 20 nM	Tg 1 μM	Tg 5 μM
HPC – S	52,24 \pm 0,31	38,56 \pm 0,26	2,25 \pm 0,10
HPC – M	80,76 \pm 0,43	61,55 \pm 3,00	50,18 \pm 0,14
MES – S	64,70 \pm 0,16	28,65 \pm 0,80	2,82 \pm 0,27
MES – M	51,47 \pm 3,78	35,67 \pm 0,30	37,05 \pm 0,36

4.4.3. O papel da captação de Ca^{2+} mitocondrial na toxicidade induzida por rotenona em um modelo *in vitro* de DP.

Para verificar se a captação de Ca^{2+} mitocondrial exerce alguma influência na toxicidade induzida por rotenona neste modelo *in vitro* de DP, utilizamos o vermelho de rutênio, um bloqueador do uniporte de Ca^{2+} mitocondrial. Nestes experimentos, o tratamento foi feito com a concentração de 20 nM de rotenona durante sete dias. As concentrações de vermelho de rutênio utilizadas nestes experimentos foram escolhidas de acordo com experimentos realizados anteriormente por outros autores (Düzenli *et al.*, 2005). As culturas foram divididas em quatro grupos: grupo controle, grupo tratado com 20 nM de rotenona, grupo tratado com 20 nM de rotenona + 1 μM de vermelho de rutênio e grupo tratado com 20 nM de rotenona + 5 μM de vermelho de rutênio.

De acordo com os resultados, o vermelho de rutênio não exerceu influência estatisticamente significativa na viabilidade celular de culturas semipuras derivadas de hipocampo na concentração de 1 μM , enquanto que nas culturas semipuras derivadas de mesencéfalo ventral houve uma discreta redução no efeito neurotóxico da rotenona, na mesma concentração testada. Os experimentos realizados com culturas mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral mostraram que na concentração de 1 μM , houve uma redução mais acentuada da toxicidade devida à rotenona, confirmado pela análise estatística. Porém, na concentração de 5 μM , houve uma potencialização do efeito tóxico da rotenona com redução da viabilidade celular nos quatro tipos de culturas testados, (Figuras 15 e 16; Tabela 8).

O ensaio de viabilidade celular mostrou que as culturas semipuras derivadas de tecido hipocampal apresentaram viabilidade celular de $63,97 \pm 1,66 \%$, $65,34 \pm 1,82 \%$ e $44,25 \pm 0,24 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + 1 μM de vermelho de rutênio e rotenona + 5 μM de vermelho de rutênio, respectivamente (Figura 15A; Tabela 8). As culturas mistas derivadas de tecido hipocampal apresentaram viabilidade celular de $87,79 \pm 4,37 \%$, $100,81 \pm 0,24 \%$ e $79,16 \pm 6,46 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + 1 μM de vermelho de rutênio e rotenona + 5 μM de vermelho de rutênio, respectivamente (Figura 15B; Tabela 8).

Os experimentos com culturas semipuras derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade celular de $61,17 \pm 0,32 \%$, $56,22 \pm 1,43 \%$ e $37,65 \pm 1,99 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + 1 μM de vermelho de rutênio e rotenona + 5 μM de vermelho de rutênio, respectivamente (Figura 16A; Tabela 8). As culturas mistas de neurônio/glia derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram viabilidade celular de $51,57 \pm 0,04 \%$, $71,39 \pm 2,33 \%$ e $43,45 \pm 2,12 \%$ em relação ao controle, quando tratadas com rotenona, rotenona + 1 μM de vermelho de rutênio e rotenona + 5 μM de vermelho de rutênio, respectivamente (Figura 16B; Tabela 8).

Tabela 8: A influência da captação de Ca^{2+} mitocondrial na viabilidade celular em cultura de células expostas à rotenona. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. HPC , Hipocampo; MES, Mesencéfalo ventral; S, Semipura de neurônio; M, Mista neurônio/glia; Rot, Rotenona; VR, Vermelho de rutênio.

	Rot 20 nM	VR 1 μM	VR 5 μM
HPC – S	63,97 \pm 1,66	65,34 \pm 1,82	44,25 \pm 0,24
HPC – M	87,79 \pm 4,37	100,81 \pm 0,24	79,16 \pm 6,46
MES – S	61,17 \pm 0,32	56,22 \pm 1,43	37,65 \pm 1,99
MES – M	51,57 \pm 0,04	71,39 \pm 2,33	43,45 \pm 2,12

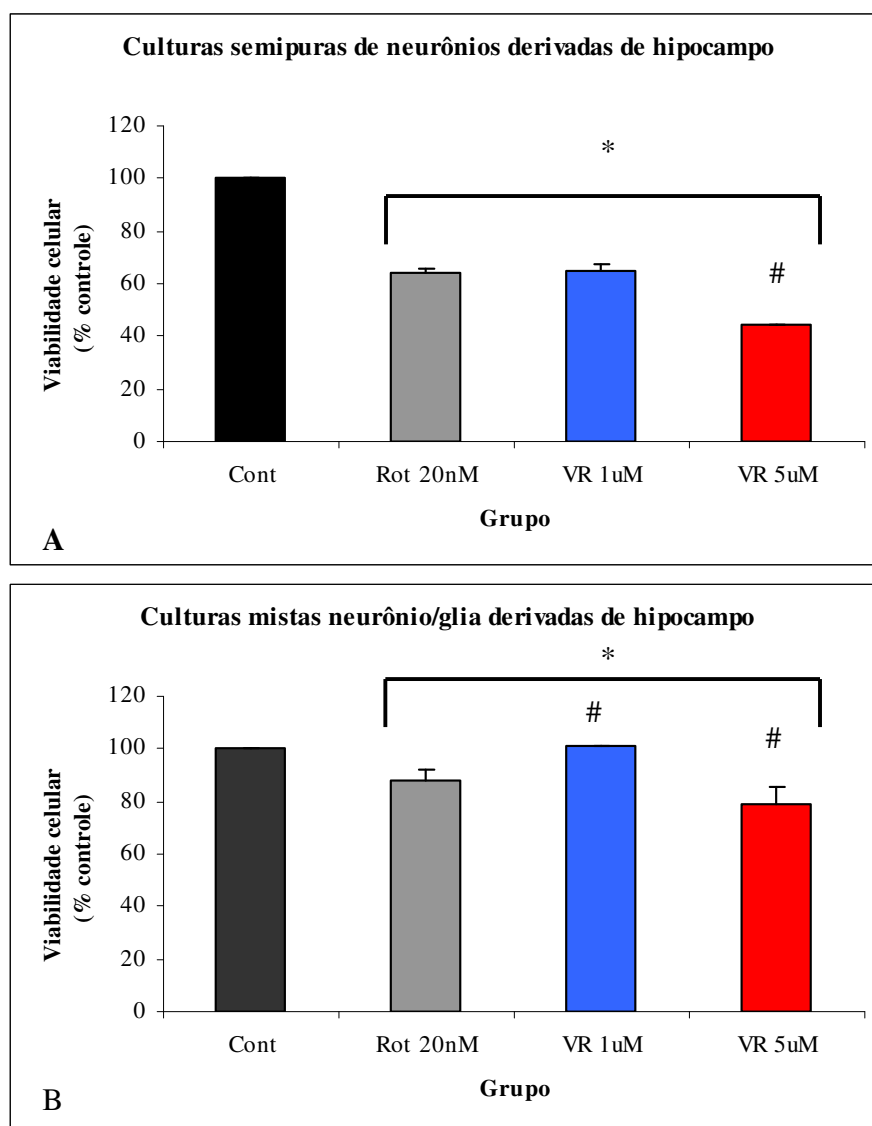


Figura 15: Influência da captação de Ca^{2+} mitocondrial na viabilidade celular de culturas derivadas de hipocampo. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparados ao controle; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo Rot 20 nM. Cont, Controle; Rot, Rotenona; VR, Vermelho de rutênio.

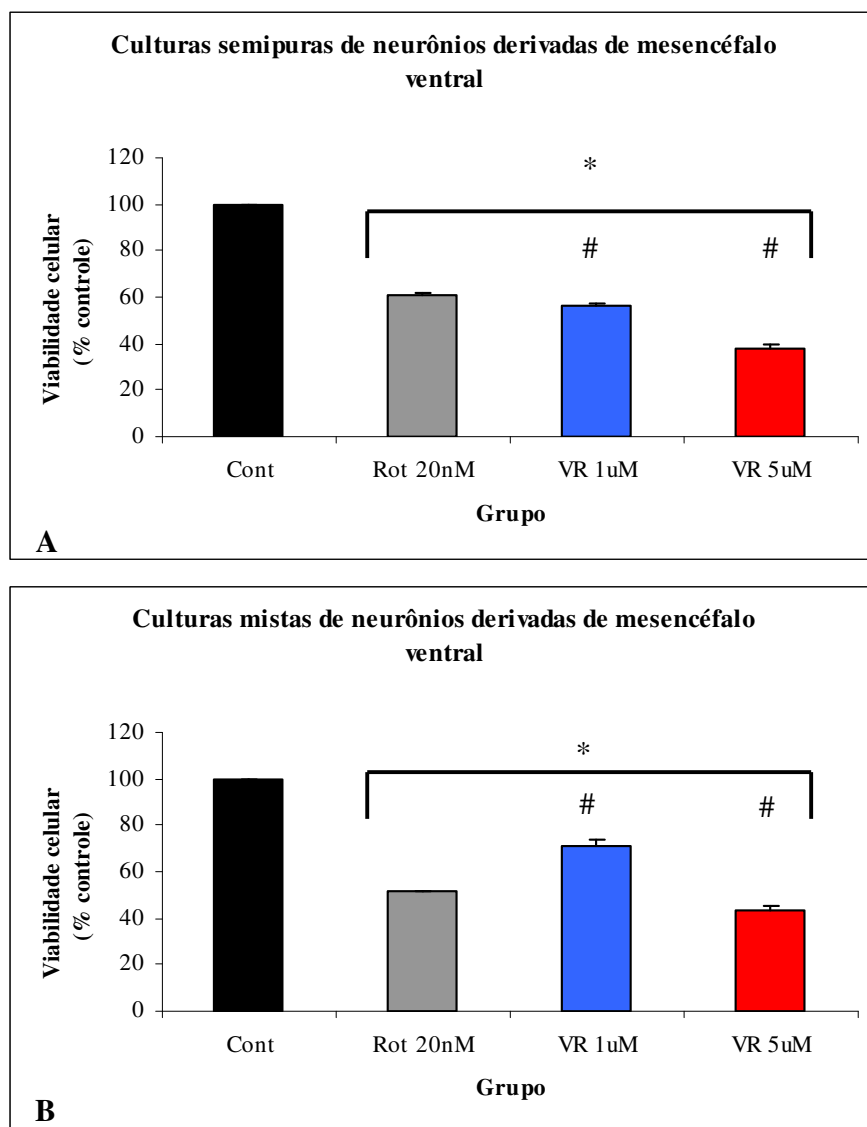


Figura 16: Influência da captação de Ca^{2+} mitocondrial na viabilidade celular de culturas derivadas de mesencéfalo ventral. Resultados expressos em porcentagem do controle \pm desvio padrão. (*) $p < 0,05$ comparado ao controle; (#) $p < 0,05$ comparado ao grupo Rot 20 nM. Cont, Controle; Rot, Rotenona; VR, Vermelho de rutênio.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho se baseia no êxito recente em se demonstrar efeitos degenerativos de diversos pesticidas sobre o sistema nigroestriatal dopaminérgico em animais experimentais, como fundamento para se investigar mecanismos celulares subjacentes à etiologia da DP. Assim, depois que Betarbet et al. (2000) reportaram que a administração crônica de rotenona, um composto muito utilizado como herbicida em diversos países e como piscicida na Amazônia brasileira, resultou em destruição seletiva de células dopaminérgicas da SNpc, formação de inclusões citoplasmáticas semelhantes a corpos de Lewy, e no aparecimento de distúrbios motores (hipocinesia e rigidez) em ratos, reproduzindo as características mais importantes da DP em humanos, vimos a necessidade de complementar estes estudos com experimentos *in vitro*, a fim de examinar possíveis mecanismos através dos quais a inibição do complexo I mitocondrial poderia causar ou potencializar a morte neuronal. Assim, nos próximos parágrafos, iremos discorrer sobre os efeitos da exposição à rotenona em diferentes concentrações, diferentes tempos de exposição, diferentes condições de cultura, além de investigar a possível participação das vias de sinalização dependentes de íons Ca^{2+} nestes efeitos.

5.1. COMPOSIÇÃO CELULAR DAS CULTURAS

Diversos protocolos para obtenção de culturas primárias neuronais são hoje disponíveis na literatura científica, capazes de gerar, segundo seus autores, padrões diferentes em termos de composição de neurônios, células da glia e seus subtipos.

Nos protocolos utilizados neste trabalho, culturas mistas de mesencéfalo ventral mostraram-se constituídas de $\cong 29\%$ de astrócitos, 22% de microglia e 16% de neurônios dopaminérgicos, enquanto que as culturas semipuras de mesencéfalo ventral apresentaram $\cong 9\%$ de astrócitos, 9% de microglia e 12% de neurônios dopaminérgicos. As culturas mistas derivadas de hipocampo apresentaram fenótipo com $\cong 15\%$ de astrócitos, 10% de microglia e 10% de neurônios dopaminérgicos, enquanto que as culturas semipuras de hipocampo apresentaram $\cong 11\%$ de astrócitos, 9% de microglia e 14% de neurônios dopaminérgicos (Figura 5).

Em estudo realizado por Gao *et al.* (2002), foi utilizado protocolo para obtenção de culturas primárias mistas derivadas de mesencéfalo ventral, com a utilização de meio essencial mínimo (MEM) suplementado com 10% HS, 10% FBS, 1 g/L de glicose, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, $100\text{ }\mu\text{M}$ de aminoácidos não-essenciais, 50 U/ml de penicilina e $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, mantidas em condições adequadas (37° C em atmosfera umidificada com 5% CO_2). Como resultado, os autores obtiveram a seguinte composição: $\cong 12\%$ OX-42, 48% para GFAP, 40% para Neu-N, específicos para marcação de microglia, astrócitos e neurônios, respectivamente. Do total de neurônios reativos para Neu-N, $2,8$ a $3,8\%$ apresentaram-se também imunorreativos para o anticorpo anti-TH (tirosina-hidroxilase), específico para marcação de neurônios dopaminérgicos, após sete dias *in vitro*. O mesmo autor demonstrou que a adição de $5\text{--}10\text{ }\mu\text{M}$ de citosina- β -D-arabinofuranosídeo (Ara-C), após dois dias *in vitro*, promovia o crescimento de culturas semipuras de neurônios, com redução do crescimento de células gliais. O padrão imunocitoquímico resultante mostrou, após sete dias *in vitro*, $< 0,1\%$ de células

imunorreativas para o anticorpo OX-42, 8 % para GFAP, sendo que do restante, 2,7 a 3,9 % apresentou marcação por anti-TH.

Em outro estudo feito por Kim *et al.* (2000), os autores desenvolveram protocolo para culturas mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo, de tecido cortical e de mesencéfalo a partir de ratos embrionários da linhagem Fischer 344 entre 16-17 dias. As culturas foram mantidas em MEM suplementado com 10 % HS, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100 μ M de aminoácidos não-essenciais, 15 mM de KCl, 50 U/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomicina e 50 μ g/ml de gentamicina. Estas culturas apresentaram no sétimo dia de cultura uma distribuição, no hipocampo, com 65 % de neurônios e 5,8 % de microglia; culturas corticais apresentaram 60 % de neurônios e 2,8 % de microglia, enquanto que as culturas mesencefálicas apresentaram 42 % de neurônios e 20 % de microglia; o restante foi supostamente composto por astrócitos.

Em um trabalho mais recente, culturas mesencefálicas mistas neurônio/glia, mantidas em MEM suplementado com 10 % de FBS inativado por calor, 10 % de HS inativado por calor, 1 g/l de glicose, 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 100 μ M de aminoácidos não-essenciais, 50 U/ml de penicilina e 50 μ g/ml de estreptomicina, em ambiente adequado, apresentou padrão fenotípico com ~ 48 % de astrócitos, 11 % de microglia e 40 % de neurônios, dos quais \cong 1 % foram imunorreativos para o anticorpo anti-TH. Para a obtenção de culturas semipuras de neurônios, o meio de cultura foi suplementado após 24 horas com 7,5 μ M de Ara-C para inibir a proliferação glial, resultando em culturas com 95 % de neurônios (Zhang *et al.*, 2005).

O protocolo desenvolvido e utilizado neste trabalho apresentou constituição de neurônios e gliócitos relativamente diferente da encontrada em outros estudos, a despeito de que também houve heterogeneidade entre os resultados anteriormente mencionados, o que demonstra grande variabilidade entre protocolos e seus resultados. Os protocolos também diferem bastante, especialmente no que se refere ao meio essencial utilizado para a proliferação celular (MEM, MEM suplementado, Neurobasal, etc), ao inibidor de crescimento glial (Ara-C, B-27), à densidade de plaqueamento, que podem, somadas, gerar discrepâncias menores aqui mencionadas.

Nosso estudo preservou, no entanto, algumas características esperadas em função de outros trabalhos citados na literatura. Nossos resultados mostram que as culturas mesencefálicas, mistas ou semipuras, apresentaram maior densidade de neurônios dopaminérgicos (ou reativos para TH) do que as culturas derivadas de hipocampo, confirmando nossa suspeita de que nesta região, por compreender a substância negra, que sabidamente possui elevada densidade de neurônios dopaminérgicos, teríamos maior densidade deste fenótipo neuronal. Além disso, as culturas mistas neurônio/glia, derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, apresentaram maior densidade de células gliais, astrócitos e microglia, do que as culturas semipuras de neurônios. Esta constatação nos habilita a cogitar possíveis funções ou influências dos componentes gliais (astrócitos e/ou microglia) neste modelo de neurodegeneração resultante da exposição à rotenona. Adicionalmente, as culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram densidade de células microgliais bem maior do que as culturas derivadas de hipocampo, também confirmando dados presentes na literatura (Hartmann *et al.*, 2003; Lawson *et al.*, 1990). Em função de que não realizamos a dissecação da substância negra a partir do

mesencéfalo ventral, é bem provável que estejamos diluindo a densidade de neurônios dopaminérgicos, uma vez que são encontradas diversas outras populações de neurônios no mesencéfalo ventral com diferentes sistemas de neurotransmissores. Além disso, como não foi realizada imunocitoquímica para a detecção de fenótipo exclusivamente neuronal, a proporção de células TH-positivas foi calculada a partir do número total de células marcadas pela técnica de Nissl, o que provavelmente aumenta a proporção destas células dopaminérgicas em relação aos dados contidos em outros trabalhos.

Para os nossos propósitos, portanto, quando nos referimos à culturas mistas em relação à culturas semipuras, os resultados das reações de imunocitoquímica realizadas nos permitem dizer que no primeiro caso (culturas mistas) a densidade de células gliais excede substancialmente a densidade de células gliais presentes no segundo tipo de cultura (semipuras). Também nos permitem dizer que nas culturas de mesencéfalo ventral a densidade de células da glia, especialmente células da microglia, é superior à densidade encontrada em culturas de hipocampo.

5.2. PADRONIZAÇÃO DOS EFEITOS NEUROTÓXICOS DA ROTENONA SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIS.

Semelhante a diversos estudos descritos na literatura, a exposição à rotenona mostrou um efeito dependente de dose no modelo experimental *in vitro* utilizado neste trabalho, nos quatro tipos de cultura testados.

Em todas as condições testadas, as culturas semipuras somente apresentaram suscetibilidade nas concentrações de 20 e 30 nM, enquanto que as culturas mistas sofreram redução na viabilidade celular nas três concentrações testadas.

Dos quatro tipos de cultura testados, as culturas mistas derivadas de mesencéfalo ventral apresentaram maior suscetibilidade aos efeitos tóxicos da rotenona. Chama atenção, neste caso, que de acordo com nossos resultados de caracterização dos tipos celulares presentes nestas culturas e com dados já disponíveis na literatura, neste tipo de cultura encontramos, ao mesmo tempo, a maior densidade de neurônios dopaminérgicos e a maior densidade de gliócitos, especialmente células da microglia.

Como já apresentado aqui (pág. 11 – Introdução), neurônios dopaminérgicos apresentam-se como células particularmente sensíveis a insultos, tais como o provocado aqui com a exposição à rotenona, que promove danos oxidativos como resultado de inibição do complexo I mitocondrial (Greenamyre *et al.*, 1999; Jenner, 2001).

No outro lado deste achado, temos a combinação com grande densidade de células reativas para o anticorpo OX-42, as células da microglia, que correspondem às células imunes residentes no encéfalo (Kreutzberg, 1996; Gonzalez-Scarano & Baltuch, 1999). Estes resultados confirmam o que já se encontra bem documentado na literatura, de que a região do mesencéfalo da qual faz parte a SN apresenta a mais elevada densidade de células da microglia no encéfalo (Lawson *et al.*, 1990; Kim *et al.*, 2000). Sob condições fisiológicas, estas células realizam a vigilância imune no tecido. A ativação destas tem sido associada com processos degenerativos através da produção de uma variedade de fatores pró-inflamatórios e neurotóxicos, que incluem o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina-1 β (IL-1 β), eicosanóides, óxido nítrico (NO) e ânion superóxido (Chao *et al.*, 1992; Cassarino *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000, 2001; McGuire *et al.*, 2001). Estas referências somadas apontam para a possibilidade de que a ativação microglial pode

representar um evento inicial importante que contribui para a degeneração de neurônios dopaminérgicos da SN como consequência da exposição à rotenona, sob nossas condições experimentais.

Torna-se importante mencionar, no entanto, que alguns autores sugerem que a microglia possa exercer um papel protetor contra agentes exógenos através de uma resposta inflamatória (Gao *et al.*, 2003; Lucas *et al.*, 2006; Streit *et al.*, 2005), principalmente em regiões com menor densidade destes tipos celulares.

De acordo com esta última afirmação, as culturas semipuras de neurônios derivadas de hipocampo apresentaram maior suscetibilidade aos efeitos tóxicos da rotenona que as culturas mistas, nas concentrações de 20 e 30 nM. Neste caso, apenas como hipótese, poderia estar acontecendo efeito neuroprotetor exercido pela microglia, encontrada em menor densidade nesta região do encéfalo e, assim, promovendo uma resposta inflamatória menos intensa (Gao *et al.*, 2003).

Outros trabalhos, sob diferentes condições de experimentação, já investigaram mecanismos envolvidos na neurotoxicidade induzida por rotenona. Hartley *et al.* (1994), utilizando a linhagem de células de feocromocitoma humano PC12, através das técnicas de liberação de lactato desidrogenase e análise de fragmentação de DNA, verificaram que dois inibidores do complexo mitocondrial I, MPP⁺ e rotenona, promoveram morte celular dependente de concentração concomitante com fragmentação do DNA, indicando que as células possivelmente estavam em processo de morte celular por apoptose; em contrapartida, doses muito elevadas dessas duas toxinas promoviam morte celular com fragmentação do DNA reduzida, indicando a ocorrência de morte celular por necrose. No mesmo trabalho, os autores verificaram que células da linhagem de neuroblastoma humano

SK-N-MC apresentaram os mesmos efeitos vistos em PC12; em contrapartida, células de carcinoma de pulmão humano da linhagem A549 mostraram maior resistência à indução de apoptose por estas toxinas, sem ocorrência de fragmentação do DNA. Tais resultados sugerem que, embora estas substâncias sejam potencialmente tóxicas, seus efeitos dependem, além da concentração utilizada, da suscetibilidade celular aos efeitos tóxicos de tais substâncias.

Gao *et al.* (2002), utilizando ratos da linhagem Fischer 344, mostraram que a rotenona promove redução dependente de concentração tanto na captação de dopamina quanto no número de neurônios imunorreativos para a enzima tirosina hidroxilase em culturas mesencefálicas, mistas neurônio/glia e semipuras de neurônios; neste caso, tal como observado em nossos experimentos com culturas primárias, as culturas semipuras de neurônios também mostraram menor suscetibilidade aos efeitos tóxicos da rotenona, apresentando redução na captação de dopamina estatisticamente significativa nas concentrações a partir de 25 nM, enquanto que as culturas mistas apresentaram tais efeitos nas concentrações a partir de 1 nM (Gao *et al.*, 2003b).

Em outro estudo, Sherer *et al.* (2003c), utilizando células de neuroblastoma humano da linhagem SK-N-MC, verificou que a rotenona promoveu morte celular dependente de concentração, através do método fluorescente “Sytox green”, a partir da concentração de 10 nM, bem como redução na síntese de ATP e aumento na concentração de proteínas carboniladas. Resultados semelhantes foram obtidos com outra linhagem de células de neuroblastoma humano, SH-SY5Y, as quais apresentaram aumento na percentagem de células em estado apoptótico, bem como diminuição do número de células viáveis (Wang & Xu, 2005).

Em resumo, nossos resultados confirmam o efeito neurotóxico da rotenona em culturas primárias de neurônios do hipocampo e mesencéfalo ventral, sob nossas condições experimentais, além de sugerir que a maior suscetibilidade a estes efeitos se deve a maior presença de neurônios dopaminérgicos combinada com maior densidade de células da microglia.

5.3. EFEITO DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO À ROTENONA NA VIABILIDADE CELULAR DE CULTURAS NEURONAIS DERIVADAS DE MESENCÉFALO VENTRAL.

Diversos trabalhos investigado o efeito do tempo de exposição a toxinas, em alguns modelos *in vitro* de doença de Parkinson.

No modelo utilizado por Gao *et al.* (2002), a rotenona mostrou um efeito dependente de tempo na captação de dopamina marcada em todas as concentrações testadas, sendo mais proeminente nas concentrações de 20 e 25 nM. Estes autores verificaram o efeito do tempo na captação de dopamina em intervalos de dois dias, por um período máximo de oito dias, em concentrações que variaram de 1 a 25 nM.

Em outro estudo utilizando a linhagem de células de neuroblastoma SK-N-MC verificou-se que, na concentração de 5 nM de rotenona, considerada pelos autores como subletal, houve um efeito dependente de tempo nos níveis de glutatona e de proteínas carboniladas insolúveis, indicadores de aumento na suscetibilidade ao estresse oxidativo e danos às proteínas, após um período de três semanas de tratamento. O mesmo efeito não foi verificado com regime de tratamento de uma ou duas semanas. Além disso, os níveis de

proteínas carboniladas solúveis não aumentaram, mesmo após quatro semanas de tratamento (Sherer *et al.*, 2002b).

Neste trabalho, foram utilizadas culturas derivadas de mesencéfalo ventral, mistas neurônio/glia e semipuras de neurônios, para verificar se a rotenona apresenta algum efeito tóxico dependente de tempo. O protocolo de tratamento das culturas com rotenona não mostrou efeito dependente de tempo em nenhuma das culturas testadas. Os resultados obtidos neste trabalho possivelmente podem ter ocorrido devido o protocolo de tratamento utilizado ter como dias de experimento de viabilidade celular o 7º e o 14º dias. Assim, é possível que ao fim da primeira semana de tratamento a rotenona já tenha atingido a fase de “platô” de morte celular nas três concentrações testadas e, dessa forma, a continuidade do tratamento (14 dias) não tenha revelado nenhum efeito dependente de tempo. Dessa forma, talvez seja necessário, para este modelo *in vitro*, a utilização de um protocolo de tratamento com intervalos de tempo de exposição à rotenona e ensaio de viabilidade celular mais curtos, como feito por Gao *et al.* (2002), a fim de se comparar o efeito do tempo de exposição à rotenona antes de o efeito tóxico supostamente atingir a fase de “platô” sobre a morte celular.

5.4. VIAS DEPENDENTES DE ÍONS Ca^{2+} NA TOXICIDADE INDUZIDA POR ROTENONA.

5.4.1. **O papel do Ca^{2+} extracelular na toxicidade induzida por rotenona em um modelo *in vitro* de DP.**

O Ca^{2+} é essencial para o crescimento celular, embora seus efeitos sejam muito diversificados e, devido a isso, seja difícil elucidar seus mecanismos específicos. Este íon

afeta o ciclo celular em mais de uma via: (1) a depleção dos picos de Ca^{2+} mediados por IP_3 promove paralisação do ciclo celular nas fases G0/G1 e S, (2) há a necessidade de um pico de Ca^{2+} para se completar a meiose e iniciar a mitose. Entretanto, os mecanismos específicos desses efeitos ainda estão por serem esclarecidos; não apenas a entrada de Ca^{2+} , como também os níveis intracelulares atingidos iniciam a expressão de fatores de transcrição distintos. Além disso, embora esse aumento do Ca^{2+} intracelular afete a expressão gênica e promova a progressão do ciclo celular, ele pode também ativar processos de morte celular programada ou apoptose (Clapham, 1995).

Sabendo-se que o influxo de Ca^{2+} para o citosol também pode estar correlacionado com toxicidade celular (Sousa *et al.*, 2003), duas drogas que agem alterando a homeostase do Ca^{2+} extracelular, a nifedipina e o EDTA, foram utilizadas em nossos experimentos para avaliar se o influxo deste íon tem alguma relação com a diminuição da viabilidade celular devida à rotenona nos diferentes tipos de cultura aqui testados. Embora tanto o tratamento com EDTA quanto com nifedipina tenham demonstrado algumas alterações estatisticamente significativas na viabilidade celular, estas foram muito discretas. Essas pequenas alterações na viabilidade celular causadas tanto pela nifedipina quanto pelo EDTA podem ter acontecido possivelmente devido ao efeito de outras fontes de Ca^{2+} sobre os efeitos tóxicos da rotenona, como por exemplo, os estoques intracelulares, avaliados com outras drogas. Não pode ser descartado também o fato de que não foram avaliadas outras concentrações destes compostos, o que pode estar sub-dimensionando o efeito desta importante fonte de íons Ca^{2+} no processo degenerativo induzido por rotenona.

Estes resultados encontram em desacordo com a maioria dos experimentos semelhantes realizados por outros grupos. Por exemplo, em um estudo conduzido por Sousa

et al. (2003), verificou-se que tanto o aumento extracelular na concentração de Ca^{2+} quanto de rotenona promoveram aumento na produção de radicais livres de maneira dependente de concentração, sendo que a administração de EGTA, um quelante de Ca^{2+} extracelular, promoveu redução na produção de radicais livres. Além disso, este estudo demonstrou um efeito sinérgico entre o Ca^{2+} e a rotenona.

Em outro estudo feito por Wang & Xu (2005), utilizando células de neuroblastoma humano da linhagem SH-SY5Y, através das técnicas de citometria de fluxo e espectrofluorometria, verificou-se que o tratamento com rotenona em concentrações micromolares por 24 e 48 horas promoveu aumento no número de células apoptóticas com redução no número de células viáveis de maneira dependente de dose e de tempo, com concomitante elevação na concentração de Ca^{2+} intracelular. Em adição, a administração de nifedipina reduziu parcialmente o influxo deste íon e a utilização de BAPTA, um quelante de Ca^{2+} intracelular, reduziu o índice de células apoptóticas; sendo que nimodipina, um outro inibidor de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem semelhante à nifedipina, em concentrações micromolares, promoveu redução na morte celular induzida por NMDA em culturas de células granulares cerebelares expostas agudamente (Düzenli *et al.*, 2005). Entretanto, o tratamento crônico com rotenona não mostrou alteração nos níveis de ERO formadas; além disso, a exposição por menos de duas semanas a concentração de 5 nM de rotenona não alterou a sinalização do Ca^{2+} nesta população de células (Sherer *et al.*, 2001).

5.4.2. O papel do Ca^{2+} microssomal na toxicidade induzida por rotenona em um modelo *in vitro* de DP.

O retículo endoplasmático age como uma rede para proteínas ligantes de Ca^{2+} e seqüestra ativamente este íon para o espaço intraorganelar. As ATPases dependentes de Ca^{2+} (“bombas” de Ca^{2+}) presentes na membrana da organela utilizam ATP para bombear o Ca^{2+} para dentro da organela, onde ele é conjugado a moléculas tamponantes de Ca^{2+} , como por exemplo a calsequestrina, sem função intracelular conhecida, mas que age como molécula de armazenamento dinâmico de alta afinidade e capacidade de captar Ca^{2+} . Embora as ferramentas farmacológicas para o estudo das bombas de Ca^{2+} não existam em abundância, a tapsigargina é uma substância que inibe irreversivelmente as bombas de Ca^{2+} de forma bastante específica. Esta substância tem sido amplamente utilizada para promover extensa depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelulares (Clapham, 1995).

Os resultados aqui apresentados sugerem que a bomba de Ca^{2+} microssomal exerce influência na viabilidade celular nos quatro tipos de culturas testados. Os resultados estão de acordo com o esperado, uma vez que a bomba de Ca^{2+} é bastante importante para a manutenção da homeostase deste íon. Sob nossas condições experimentais, a tapsigargina potencializou os efeitos tóxicos da rotenona, provavelmente por promover aumento demasiado na concentração de Ca^{2+} intracelular, promovendo redução ainda maior da viabilidade celular nas duas concentrações utilizadas. Ainda, as culturas semipuras de neurônios, derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, sofreram redução total na viabilidade celular. De vez que evidências na literatura sugerem que o aumento prolongado da concentração de Ca^{2+} no citosol pode promover diversos danos celulares como, por exemplo, ativação de nucleases que clivam e degradam a cromatina da célula, bem como a

ativação de vias de morte celular por apoptose (Wang & Xu, 2005), estes resultados reforçam fortemente a sugestão de efeitos deletérios resultantes de aumentos na $[Ca^{2+}]_i$.

Existem poucas referências na literatura que tenham tentado endereçar a mesma pergunta apresentada aqui. Em acordo com nossos resultados, em um destes estudos, realizado com culturas de células granulares cerebelares, a adição de dantroleno, um inibidor da liberação dos estoques de Ca^{2+} intracelulares, e supostamente uma droga que antagoniza os efeitos da tapsigargina, promoveu neuroproteção contra a excitotoxicidade mediada por NMDA (Düzenli *et al.*, 2005).

5.4.3. O papel da captação de Ca^{2+} mitocondrial na toxicidade induzida por rotenona em um modelo *in vitro* de DP.

A mitocôndria pode acumular Ca^{2+} até níveis acima de 0,5 mM na matriz mitocondrial, em função do grande gradiente eletroquímico criado pela troca de prótons (H^+). O uniporte mitocondrial tem afinidade menor que as bombas de Ca^{2+} do retículo endoplasmático e é, provavelmente, significante apenas quando o Ca^{2+} citosólico ultrapassa a concentração de 0,5 μ M. Sob condições patológicas, a mitocôndria tem capacidade de absorver grandes quantidades de Ca^{2+} , principalmente através deste uniporte mitocondrial (Clapham, 1995). Quando esta capacidade é superada, ocorre colapso do potencial de membrana mitocondrial e o Ca^{2+} é liberado juntamente com moléculas de baixo peso molecular que funcionam como soluto criando um gradiente osmótico no espaço intermembranar e, dessa forma, causando ruptura da membrana externa. Este fenômeno, conhecido como transição da permeabilidade mitocondrial, ocorre devido à abertura de um

grande poro presente na membrana interna, o poro de transição da permeabilidade mitocondrial, sendo um mecanismo de liberação de citocromo *c* e outras proteínas pró-apoptóticas, como pró-caspases e fator indutor de apoptose (Nicholls, 2005; Saris & Carafoli, 2005).

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o vermelho de rutênio não exerceu, ou exerceu de forma discreta, influência na viabilidade celular de culturas semipuras derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral na concentração de 1 μM quando administrado juntamente com rotenona. Os experimentos realizados com culturas mistas neurônio/glia derivadas de hipocampo e de mesencéfalo ventral, no entanto, mostraram que na concentração de 1 μM , o vermelho de rutênio promoveu redução na toxicidade devida à rotenona, confirmado pela análise estatística; e de acordo com algumas evidências na literatura (Dessi *et al.*, 1995; Düzenli *et al.*, 2005; Tapia & Velasco, 1997). Esse efeito neuroprotetor pode ter ocorrido devido o vermelho de rutênio ter inibido a captação de Ca^{2+} mitocondrial, reduzindo assim o risco de sobrecarga deste íon para o interior da organela nesta situação de insulto. Em nítido contraste, na concentração de 5 μM , houve uma potencialização do efeito tóxico da rotenona com redução da viabilidade celular nos quatro tipos de culturas testados. A razão para isto, que corrobora outros resultados igualmente conflitantes na literatura (Dessi *et al.*, 1995; Düzenli *et al.*, 2005; Tapia & Velasco, 1997), pode ser devido ao caráter inespecífico deste bloqueador, que reconhecidamente pode também atuar sobre outros sítios de ligação para íons Ca^{2+} , tais como canais Ca^{2+} dependentes de voltagem, proteínas ligantes de Ca^{2+} , transportadores de membrana, etc, em função da utilização da concentração subtóxica.

Em um estudo feito por Dessi *et al.* (1995), verificou-se que a exposição de células granulares cerebelares ao glutamato aumentou dramaticamente a concentração de Ca^{2+} citosólico paralelamente com aumento na concentração de Ca^{2+} mitocondrial. Estes aumentos na concentração de Ca^{2+} foram seguidos por intensa morte celular; a administração de vermelho de rutênio diminuiu drasticamente tanto o acúmulo de Ca^{2+} pela mitocôndria quanto a morte celular promovida neste modelo experimental. Além disso, Düzenli *et al.* (2005) verificaram que o vermelho de rutênio promoveu redução na morte celular induzida por NMDA, da mesma população de células, de maneira dependente de dose, analisada pela técnica do azul Trypan; Em nítido contraste, a administração isolada de vermelho de rutênio promoveu morte celular.

Em contrapartida, Velasco *et al.* (1995), utilizando o método do MTT, verificaram que a administração de vermelho de rutênio mostrou toxicidade celular dependente de dose e de tempo em culturas primárias de neurônios do córtex e do cerebelo; as culturas primárias de astrócitos mostraram elevada resistência à toxicidade deste composto.

6. CONCLUSÕES

- A rotenona apresentou neurotoxicidade dependente de concentração, como avaliado pelo método colorimétrico do MTT; as culturas mistas, derivadas de hipocampo e de mesencéfalo, apresentaram redução na viabilidade celular nas três concentrações testadas, para as culturas semipuras o efeito neurotóxico ocorreu apenas nas concentrações de 20 e 30 nM;
- Culturas mistas de mesencéfalo ventral foram mais suscetíveis aos efeitos neurotóxicos da rotenona, quando comparadas a culturas mistas ou semipuras de hipocampo. Em especial, estas culturas apresentaram maiores densidades de neurônios tirosina hidroxilase positivos, astrócitos e microglia.
- As culturas não apresentaram efeito dependente de tempo de exposição à rotenona (7 ou 14 dias) nas três concentrações testadas;
- Em relação às vias de sinalização dependentes de íons Ca^{+2} , o Ca^{2+} extracelular apresentou pouca influência sobre a perda de viabilidade celular induzida por rotenona, pelo menos na concentração testada. O tratamento concomitante com rotenona e tapsigargina (bloqueador da captação de cálcio microssomal) resultou em aumento da toxicidade induzida por rotenona, nos quatro tipos de culturas testados. O vermelho de rutênio promoveu efeitos antagônicos, dependentes da dose testada.

Assim, promoveu redução na toxicidade induzida por rotenona nas culturas mistas na concentração de 1 μM e potencializou o efeito neurotóxico na concentração de 5 μM .

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAM, M., SCHMIDT, W.J. L-DOPA reverses the hypokinetic behaviour and rigidity in rotenone-treated rats. **Behavioural Brain Research** **153**: 439-446, 2004.
- ALAM, M. & SCHMIDT, W.J. Rotenone destroys dopaminergic neurons and induces parkinsonian symptoms in rats. **Behavioural Brain Research** **136**: 317-324, 2002.
- BA, F., PANG, P.K.T., BENISHIN, C.G. Role of Ca²⁺ channel modulation in the neuroprotective actions of estrogen in β -amyloid protein and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) cytotoxic models. **Neurochemistry International** **45**: 31-38, 2004.
- BEAL, M.F., Experimental models of Parkinson's disease. **Nature Reviews Neuroscience** **2**: 325-332, 2001.
- BETARBET, R., SHERER, T.B., MACKENZIE, G., GARCIA-OSUNA, M., PANOV, A.V., GREENAMYRE, J.T. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. **Nature Neuroscience** **3**: 1301-1306, 2000.
- BOKA, G., ANGLADE, P., WALLACH, D., JAVOY-AGID, F., AGID, Y., HIRSCH, E.C. Immunocytochemical analysis of tumor necrosis factor and its receptors in Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** **82**: 615-624, 1994.
- BONNEFOY-BERARD, N., GENESTIER, N., FLACHER, M., REVILLARD, J.P. The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines. **European Journal of Immunology** **24**: 324-329, 1994).
- BRONSTEIN, D.M., PEREZ-OTANO, I., SUN, V., MULLIS SAWIN, S.B., CHAN, J.,

- WU, G.C., HUDSON, P.M., KONG, L.Y., HONG, J.S., MCMILLIAN, M.K. Glia-dependent neurotoxicity and neuroprotection in mesencephalic cultures. **Brain Research** **704**: 112-116, 1995.
- CALNE, D.B. The neuromythology of Parkinson's disease. **The Parkinsonism and Related Disorders** **10** (5): 319–322, 2004.
- CARRASCO, E. & WERNER, P. Selective destruction of dopaminergic neurons by low concentrations of 6-OH-DA and MPP⁺: protection by acetylsalicylic acid aspirin. **Parkinsonism & Related Disorders** **8** (6): 407-11, 2002.
- CASSARINO, D.S., FALL, C.P., SWERDLOW, R.H., SMITH, T.S., HALVORSEN, E.M., MILLER, S.W., PARKS, J.P., PARKER, W.D. Jr., BENNETT, J.P. Jr. Elevated reactive oxygen species and antioxidant enzyme activities in animal and cellular models of Parkinson's disease. **Biochimica et biophysica acta** **1362** (1): 77-86, 1997.
- CASTANO, A., HERRERA, A.J., CANO, J., MACHADO, A. The degenerative effect of a single intranigral injection of LPS on the dopaminergic system is prevented by dexamethasone, and not mimicked by rh-TNF-alpha, IL-1-beta and IFN-gamma. **Journal of Neurochemistry** **81**: 150-157, 2002.
- CLAPHAM, D.E. Calcium signaling. **Cell** **80**: 259-268, 1995.
- COSTA, E.T., OLIVEIRA, D.S., MEYER, D.A., FERREIRA, V.M.M., SOTO, E.E., FRAUSTO, S., SAVAGE, D.D., BROWNING, M.D., VALENZUELA, C.F. Fetal alcohol exposure alters neurosteroid modulation of hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors. **The Journal of Biological Chemistry** **275**: 38268-38274, 2000.
- DAUER, W. & PRZEDBORSKI, S. Parkinson's disease: Mechanisms and models. **Neuron** **39**: 889-909, 2003.

- DAVEY, G.P. & CLARK, J.B. Threshold effects and control of oxidative phosphorylation in nonsynaptic rat brain mitochondria. **Journal of Neurochemistry** **66**: 1617-1624, 1996.
- DAY, B.J., PATEL, M., CAVALETTA, L., CHANG, L.Y., STAMLER, J.S. A mechanism of paraquat toxicity involving nitric oxid syntase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **96**: 12760-12765, 1999.
- DESSI, F., BEN-ARI, Y., CHARRIAUT-MARLANGUE, C. Ruthenium red protects against glutamate-induced neuronal death in cerebellar culture. **Neuroscience Letters** **201**: 53-56, 1995.
- DÜZENLI, S., BAKURIDZE, K., GEPIREMEN, A. The effects of ruthenium red, dantrolene and nimodipine, alone or in combination, in NMDA induced neurotoxicity of cerebellar granular cell culture of rats. **Toxicology in vitro** **19**: 589-594, 2005.
- FEANY, M.B. & BENDER, W.W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature** **404**: 394-398, 2000.
- FERRANTE, R.J., SCHULZ, J.B., KOWALL, N.W., BEAL, M.F. Systemic administration of rotenone produces selective damage in the striatum and globus pallidus, but not in the substantia nigra. **Brain Research** **753**: 157-162, 1997.
- FREED, C.R., GREENE, P.E., BREEZE, R.E., TSAI, W.Y., DUMOUCHEL, W., KAO, R., DILLON, S., WINFIELD, H., CULVER, S., TROJANOWSKI, J.Q., EIDELBERG, D., FAHN, S. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. **New England Journal of Medicine** **344**: 710-719, 2001.
- FREI, B. & RICHTER, C. N-methyl-4-phenylpyridine (MPP⁺) together with 6-hydroxydopamine or dopamine stimulates Ca²⁺ release from mitochondria. **FEBS**

Letters 198: 99-102, 1986.

GAO, H.M., LIU, B., ZHANG, W., HONG, J.S. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **TRENDS in Pharmacological Sciences 24:** 395-401, 2003.

GAO, H.M., HONG, J.S., LIU, B. Synergistic dopaminergic neurotoxicity of the pesticide rotenone and inflammogen lipopolisaccharide: relevance to the etiology of Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience 23** (4): 1228-1236, 2003b.

GAO, H.M., HONG, J.S., ZHANG, W., LIU, B. Distinct role for microglia in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. **Journal of Neuroscience 22:** 782-790, 2002

GERLACH, M. & RIEDERER, P. Animal models of Parkinson's disease: an empirical comparison with the phenomenology of the disease in man. **Journal of Neural Transmission 103** (8-9): 987-1041, 1996.

GIASSON, B.I., DUDA, J.E., MURRAY, I.V., CHEN, Q., SOUZA, J.M., HURTOG, H.I., ISCHIROPOULOS, H., TROJANOWSKI, J.K., LEE, V.M. Oxidative damage linked to neurodegeneration by selective alpha-synuclein nitration in synucleinopathy lesions. **Science 290:** 985-989, 2000.

GONZALEZ-SCARANO, F. & BALTUCH, G. Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. **Annual review of neuroscience 22:** 219-40, 1999.

GREENAMYRE, J.T., MACKENZIE, G., PENG T.I., STEPHANS, S.E. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. **Biochemical Society symposium 66:** 85-97, 1999.

HARTLEY, A., STONE, J.M. HERON, C., COOPER, J.M., SCHAPIRA, A.H.V. Complex I inhibitors induce dose-dependent apoptosis in PC12 cells: relevance to Parkinson's disease. **Journal of Neurochemistry 63** (5): 1987-1990, 1994.

- HARTMANN, A., HUNOT, S., HIRSCH, E.C. Inflammation and dopaminergic neuronal loss in Parkinson's disease: a complex matter. **Experimental Neurology** **184**: 561-564, 2003.
- HE, Y., APPEL, S., LE, W. Minocycline inhibits microglial activation and protects nigral cells after 6-hydroxydopamine injection into mouse striatum. **Brain Research** **909**: 187-193, 2001.
- HERRERA, A.J., CASTANO, A., VENERO, J.L., CANO, J., MACHADO, A. The single intranigral injection of LPS as a new model for studying the selective effects of inflammatory reactions on dopaminergic system. **Neurobiology of Disease** **7**: 429-447, 2000.
- HÖGLINGER, G.U., FÉGER, J., PRIGENT, A., MICHEL, P.P., PARAIN, K., CHAMPY, P., RUBERG, M., OERTEL, W.H., HIRSCH, E.C. Chronic systemic complex I inhibition induces a hypokinetic multisystem degeneration in rats. **Journal of Neurochemistry** **84**: 491-502, 2003.
- JENNER, P. Parkinson's disease, pesticides and mitochondrial dysfunction. **Trends in neurosciences** **24** (5): 245-7, 2001.
- KIM, W.G., MOHNEY, R.P., WILSON, B., JEOHN, G.H., LIU, B., HONG, J.S.. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in the rat brain: role of microglia. **Journal of Neuroscience** **20**: 6309-6316, 2000.
- KITADA, T., ASAKAWA, S., HATTORI, N., MATSUMINE, H., YAMAMURA, Y., MINOSHIMA, S., YOKOCHI, M., MIZUNO, Y., SHIMIZU, N. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. **Nature** **392**: 605-608, 1998.

- KITAMURA, Y., SHIMOHAMA, S., AKAIKE, A., TANIGUCHI, T. The parkinsonian models: invertebrates to mammals. **The Japan Journal of Pharmacology** **84**: 237-243, 2000.
- KREUTZBERG, G.W. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. **Trends in neurosciences** **19** (8): 312-8, 1996.
- KURKOWSKA-JASTRZEBSKA, I., WRONSKA, A., KOHUTNICKA, M., CZLONKOWSKI, A., CZLONKOWSKA, A. The inflammatory reaction following 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridine intoxication in mouse. **Experimental Neurology** **156**: 50-61, 1999.
- LAI, J.C. & BLASS, J.P. Inhibition of brain glycolysis by aluminum. **Journal of Neurochemistry** **42**: 438-446, 1984.
- LANGSTON, J.W., FORNO, L.S., TETRUD, J., REEVES, A.G., KAPLAN, J.A., KARLUK, D. Evidence of active nerve cell degeneration in the substantia nigra of humans years after 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine exposure. **Annals of Neurology** **46**: 598-605, 1999.
- LANGSTON, J.W., LANGSTON, E.B., IRWIN, I. MPTP-induced parkinsonism in human and non-human – Clinical and experimental aspects. **Acta Neurologica Scandinavica** **70** (suppl 100): 49-54, 1984.
- LANGSTON, J.W. & BALLARD JR., P.A. Parkinson's disease in a chemist working with 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. **The New England Journal of Medicine** **4**: 310, 1983.
- LANGSTON, J.W., BALLARD JR., P.A., TETRUD, J.W., IRWIN, I. Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science** **219**:

979-980, 1983.

LAWSON, L.J., PERRY, V.W., GORDON, S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. **Neuroscience** **39** (1): 151-170, 1990.

LE, W., ROWE, D., XIE, W., ORTIZ, I., HE, Y., APPEL, S.H. Microglial activation and dopaminergic cell injury: an *in vitro* model relevant to Parkinson's disease. **The Journal of Neuroscience** **21**: 8447-8455, 2001.

LEE, H.J., SHIN, S.Y., CHOI, C., LEE, Y.H., LEE, S.J. Formation and removal of alpha-synuclein aggregates in cells exposed to mitochondrial inhibitors. **Journal of Biology Chemical** **277**: 5411-5417, 2002.

LIBERATORE, G.T., JACKSON-LEWIS, V., VUKOSAVIC, S., MANDIR, A.S., VILA, M., MCAULIFFE, W.G., DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., PRZEDBORSKI, S. Inducible oxide nitric synthase stimulates dopaminergic degeneration in the MPTP model of Parkinson's disease. **Nature Medicine** **5**: 1403-1409, 1999.

LIU, B., WANG, K., GAO, H.M., MANDAVILLI, B., WANG, J.Y., HONG, J.S. Molecular consequences of activated microglia in the brain: overactivation induces apoptosis. **Journal of Neurochemistry** **77**: 182-189, 2001.

LIU, B., DU, L., HONG, J.S. Naloxone protects rat dopaminergic neurons against inflammatory damage through inhibition of microglia activation and superoxide generation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** **293**: 607-617, 2000.

MANNING-BOG, A.B., MCCORMACK, A.L., PURISAI, M.G., BOLIN, L.M., DI MONTE, D.A. α -synuclein overexpression protects against paraquat-induced

- neurodegeneration. **The Journal of Neuroscience** **23**: 3095-3099, 2003.
- MANNING-BOG, A.B., MCCORMACK, A.L., LI, J., UVERSKI, V.N., FINK, A.L., DI MONTE, D.A. The herbicide paraquat causes upregulation and aggregation of alpha-synuclein in mice. **Journal of Biological Chemistry** **277**: 1641-1644, 2002.
- MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annual Review of Neuroscience**, **26**: 81-104, 2003.
- MCCORMACK, A.L., THIRUCHELVAM, M., MANNING-BOG, A.B., THIFFAULT, C., LANGSTON, J.W., CORY-SLECHTA, D.A., DI MONTE, D.A. Environmental risk factors and Parkinson's disease: selective degeneration of nigral dopaminergic neurons caused by the herbicide paraquat. **Neurobiology of Disease** **10**: 119-127, 2002.
- MIRZA, B., HADBERG, H., THOMSEN, P., MOOS, T. The absence of reactive astrogliosis is indicative of a unique inflammatory process in Parkinson's disease. **Neuroscience** **95** (2): 425-432, 2000.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods** **65**: 55-63, 1983.
- MUQIT, M.M. & FEANY, M.B. Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach?. **Nature Reviews Neuroscience** **3** (3): 237-43, 2002.
- NAKAMURA, K., KITAMURA, Y., TSUCHIYA, D., INDEN, M., TANIGUCHI, T. *In vitro* neurodegeneration model: dopaminergic toxin-induced apoptosis in human SH-SY5Y cells. **In: International Congress Series** **1260**: 287-290, 2004.
- NEGRE-SALVAYRE, A. & SALVAYRE, R. UV-treated lipoproteins as a model system

- for the study of biological effects of lipid peroxides on cultured cells. **Biochimica et biophysica acta** **1123**: 207–215, 1992.
- NESTLER, E.J., HYMAN, S.E., MALENKA, R.C. **Molecular Neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience**. International edition, 2001. p. 53-55.
- NICHOLLS, D.G. Mitochondria and calcium signaling. **Cell Calcium**, 2005.
- NICOTERA, P & ORRENIUS, S. The role of calcium in apoptosis. **Cell Calcium** **23**: 173–180, 1998.
- NOBRE JR., H.V., CUNHA, G.M., MAIA, F.D., OLIVEIRA, R.A., MORAES, M.O., RAO, V.S. Catechin attenuates 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced cell death in primary cultures of mesencephalic cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology** **136** (2): 175-80, 2003.
- PARKER, W.D., JR., BOYSON, S.J., PARKS, J.K. Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. **Annals of Neurology** **26**: 719-723, 1989.
- PERIER, C., BOVÉ, J., VILA, V., PRZEDBORSKI, S. The rotenone model of Parkinson's disease. **TRENDS in Neurociences** **26**: 345-346, 2003.
- POLYMEROPOULOS, M.H., LAVEDAN, C., LEROY, E., IDE, S.E., DEHEJIA, A., DUTRA, A., PIKE, B., ROOT, H., RUBENSTEIN, J., BOYER, R., STENROOS, E.S., CHANDRASEKHARAPPA, S., ATHANASSIADOU, A., PAPAPETROPOULOS, T., JOHNSON, W.G., LAZZARINI, A.M., DUVOISIN, R.C., DI IORIO, G., GOLBE, L.I., NUSSBAUM, R.L. Mutation in the α -synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. **Science** **276**: 2045-2047, 1997.
- RAJPUT, A.H., ROZDILSKY, B. and RAJPUT, A. Accuracy of clinical diagnosis in

- Parkinsonism - a prospective study. **The Canadian Journal of Neurological Sciences** **18**: 275–278, 1991.
- SADRZADEH, S.M. & SAFFARI, Y. Iron and brain disorders. **American Journal of Clinical and Pathology** **121**: 64-70, 2004.
- SALTER, M.W. & HICKS, J.L. ATP-evoked Increases in Intracellular Calcium in Neurons and Glia from the Dorsal Spinal Cord. **The Journal of Neuroscience** **14** (3): 1563-1575, 1994.
- SAMII, A., NUTT, J.G., RANSON, B.R. Parkinson's disease. **The Lancet** **363**: 1783-1793, 2004.
- SARIS, N.E.L. & CARAFOLI, E. A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. **Biochemistry** **70** (2): 187-194.
- SAWADA, H., IBI, M., KIHARA, T., URUSHITANI, M., HONDA, K., NAKANISHI, M., AKAIKE, A., SHIMOHAMA, S. Mechanisms of antiapoptotic effects of estrogens in nigral dopaminergic neurons. **FASEB Journal** **14**: 1202-1214, 2000.
- SAWADA, H., KAWAMURA, T., SHIMOHAMA, S., AKAIKE, A., KIMURA, J. Different mechanisms of glutamate-induced neuronal death between dopaminergic and non-dopaminergic neurons in rat mesencephalic culture. **Journal of Neuroscience Research** **43**: 503-510, 1996.
- SAWADA, H., SHIMOHAMA, S., TAMURA, Y., KAWAMURA, T., AKAIKE, A., KIMURA, J. Methylphenylpyridium ion (MPP⁺) enhances glutamate-induced cytotoxicity against dopaminergic neurons in cultured rat mesencephalon. **Journal of Neuroscience Research** **43**: 55-62, 1996b.
- SHERER, T.B., BETARBET, R., KIM, J.H., GREENAMYRE, J.T. Selective microglial

activation in the rat rotenone model of Parkinson's disease. **Neuroscience Letters** **341**: 87-90, 2003.

SHERER, T.B., KIM, J.H., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Subcutaneous rotenone exposure causes highly selective dopaminergic degeneration and α -synuclein aggregation. **Experimental Neurology** **179**: 9-16, 2003b.

SHERER, T.B., BETARBET, R., TESTA, C.M., SEO, B.B., RICHARDSON, J.R., KIM, J.H., MILLER, G.W., YAGI, T., MATSUNO-YAGI, A., GREENAMYRE, J.T. Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. **The Journal of Neuroscience** **23** (34): 10756–10764, 2003c.

SHERER, T.B., BETARBET, R., GREENAMYRE, J.T. Environment, mitochondria, and Parkinson's disease. **The Neuroscientist** **8**: 192-197, 2002.

SHERER, T.B., BETARBET, R., STOUT, A.K., LUND, S., BAPTISTA, M., PANOV, A.V., COOKSON, M.R., GREENAMYRE, J.T. An *in vitro* model of Parkinson's disease: linking mitochondrial impairment to altered α -synuclein metabolism and oxidative damage. **The Journal of Neuroscience** **22**: 7006-7015, 2002b.

SHERER, T.B., TRIMMER, P.A., BORLAND, K., PARKS, J.K., BENNETT JR., J.P., TUTTLE, J.B. Chronic reduction in complex I function alters calcium signaling in SH-SY5Y neuroblastoma cells. **Brain Research** **891**: 94-105, 2001.

SHIMOHAMA, S., SAWADA, H., KITAMURA, Y., TANIGUCHI, T. Disease model: Parkinson's disease. **TRENDS in Molecular Medicine** **9**: 360-365, 2003.

SHULMAN, L.M. Is there a connection between estrogen and Parkinson's disease? **Parkinsonism and Related Disorders** **8**: 289-295, 2002.

- SOUSA, S.C., MACIEL, E.N., VERCESI, A.E., CASTILHO, R.F. Ca²⁺-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. **FEBS Letters** **543**: 179-183, 2003.
- SMEYNE, M., SMEYNE, R.J. Method for culturing postnatal substantia nigra as an *in vitro* model of experimental Parkinson's disease. **Brain Research Protocols** **9**: 105-111, 2002.
- STAHL, W. & SIES, H. Reactive oxygen species. **Research Monographs. Institute for Biochemistry and Molecular Biology**, 2002.
- STREIT, W.J., CONDE, J.R., FENDRICK, S.E., FLANARY, B.E., MARIANI, C.L. Role of microglia in the central nervous system's immune response. **Neurological research** **27** (7): 685-91, 2005.
- TAKUWA, N., ZHOU, W., TAKUWA, Y. Calcium, calmodulin and cell cycle progression. **Cellular Signalling** **7**: 93-104, 1995.
- TANNER, C.M. Occupational and environmental causes of parkinsonism. **Occupational medicine** **7**: 503-513, 1992.
- TAPIA, R. & VELASCO, I. Ruthenium red as a tool to study calcium channels, neuronal death and the function of neural pathways. **Neurochemistry International** **30** (2): 137-147, 1997.
- TEISMANN, P., TIEU, K., CHOI, D.K., WU, D.C., NAINI, A., HUNOT, S., VILA, M., JACKSON-LEWIS, V., PRZEDBORSKI, S. Cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease degeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** **100**: 5473-5478, 2003.

- THOBOIS, S., DELAMARRE-DAMIER, F., DERKINDEREN, P. Treatment of motor dysfunction in Parkinson's disease: an overview. **Clinical Neurology and Neurosurgery** **107**: 269-281, 2005.
- UVERSKI, V.N., LI, J., FINK, A.L. Pesticides directly accelerate the rate of alpha-synuclein fibril formation: a possible factor in Parkinson's disease. **FEBS Letters** **500**: 105-108, 2001.
- VELASCO, I., MORAN, J., TAPIA, R. Selective neurotoxicity of ruthenium red in primary cultures. **Neurochemical research** **20** (5): 599-604, 1995.
- WANG, X.J. & XU, J.X. Possible involvement of Ca²⁺ signaling in rotenone-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. **Neuroscience Letters** **376**: 127-132, 2005.
- ZHANG, W., WANG, T., PEI, Z., MILLER, D.S., WU, X., BLOCK, M.L., WILSON, B., ZHANG, W., ZHOU, Y., HONG, J.S., ZHANG, J. Aggregated α -synuclein activates microglia: a process leading to disease progression in Parkinson's disease. **The FASEB Journal** **19**: 533-542, 2005.

ANEXO 1

MEIO DE DISSECAÇÃO

1. Preparar 2 litros (L) de PBS:

Pesar 18g de NaCl;

Pesar 2,18g de Na₂HPO₄ (Fosfato de Sódio Dibásico Anidro);

Pesar 0,64g de NaH₂PO₄ (Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado);

Medir 2L de água destilada;

Adicionar os sais até dissolvê-los por completo;

Ajustar o pH para $\cong 7,2 - 7,4$.

2. Preparação do meio de dissecação

Medir aproximadamente 1,5L de PBS;

Pesar 7,12g de HEPES;

Pesar 10g de glicose;

Completar até o volume final de 2L;

Ajustar o pH para 7,4;

Checar e ajustar (se necessário) a osmolaridade entre 320-335 mmol/Kg adicionando sacarose;

3. Os próximos passos deverão ser feitos em ambiente estéril (Cabine de fluxo laminar)

Filtrar o meio de dissecação utilizando sistema e filtração à vácuo;

Adicionar 20ml de Penicilina/Estreptomicina e 2ml de Fungizona (Note que você usará 10ml de Penicilina/Estreptomicina e 1ml de Fungizona para cada litro de meio).

Identificar os frascos e guardar no refrigerador.

ANEXO 2**SOLUÇÃO DE TRIPSINA-EDTA 0,05%****1. Preparar solução estoque de CMF (Calcium and Magnesium Free) concentrada (10x)**

Misturar os reagentes segundo a tabela abaixo:

Adicionar	500 ml	100 ml
NaCl	38,280 g	7,6560 g
KCl	1,530 g	0,3060 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	1,230 g	0,2460 g
KH ₂ PO ₄	0,306 g	0,0612 g
D-Glicose	10,990 g	2,1980 g
NaHCO ₃	3,950 g	0,7900 g

Filtrar em membrana de 0,22µm;

Preparar alíquotas em frascos estéreis;

Guardar na geladeira.

2. Preparar solução de Tripsina-EDTA 0,05%

Diluir a solução de CMF 10x;

Diluir 10 ml de tripsina-EDTA 0,25% (SIGMA) em 40ml de CMF;

Aliquotar em tubos Falcon;

Guardar no congelador.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)