

Josiel Mileno Mack

Efeitos da melatonina sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração intranasal de dimetilditiocarbamato de sódio em camundongos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Daniel S. Prediger

Coorientador: Prof. Dr. Alcir Luiz Dafré

Florianópolis – SC
2017

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

Mack, Josiel Mileno

Efeitos da melatonina sobre as alterações
comportamentais e bioquímicas induzidas pela
administração intranasal de dimetilditiocarbamato
de sódio em camundongos / Josiel Mileno Mack ;
orientador, Rui Daniel Schroder Prediger,
coorientador, Alcir Luiz Dafre, 2017.
225 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

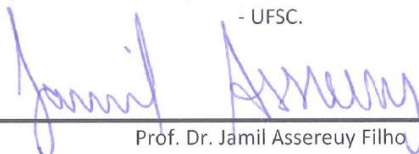
1. Farmacologia. 2. Doença de Parkinson. 3.
Vetorização olfatória. 4. Dimetilditiocarbamato de
sódio. 5. Pesticidas. I. Prediger, Rui Daniel
Schroder. II. Dafre, Alcir Luiz. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia. IV. Título.

“Efeitos da melatonina sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pela administração intranasal de dimetilditiocarbamato de sódio em camundongos”

Por

Josiel Mileno Mack

Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (23/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



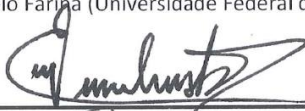
Dr. Rui Daniel Prediger (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



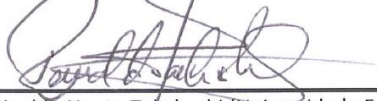
Dr. Edmar Miyoshi (Universidade Estadual de Ponta Grossa)



Dr. Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. José Eduardo da Silva Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. Reinaldo Naoto Takahashi (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 05 de outubro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais José e Evanir e à minha noiva Franciane.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais José e Evanir pelo apoio incondicional, amor e compreensão pelos momentos de ausência.

A minha noiva Franciane pelo apoio e incentivo em todas as etapas, auxílio técnico e científico e pelo amor a mim dedicado.

Ao meu irmão Eloi, minha cunhada Denise, e minha sobrinha Luísa, pelo apoio e motivação.

Ao professor Dr. Rui Daniel S. Prediger pela oportunidade em realizar o doutorado sob sua orientação, ensinamentos, incentivo, amizade e bom convívio durante este período.

Ao professor Dr. Alcir Luiz Dafre pela co-orientação, amizade e ensinamentos durante este período.

Aos integrantes do LabDef pela amizade, bom convívio e auxílio técnico nos experimentos lá realizados.

A professora Dra. Carla Inês Tasca, assim como a Dra. Débora Lanznaster e ao Caio Massari, do Laboratório de Neuroquímica 4, pela colaboração na dosagem de espécies reativas e danos a membrana celular.

Ao prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (Universidade Federal de Santa Maria) pela amizade e auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos integrantes e ex-integrantes do Lexdon, Andréia, Angela, Bruna, Filipe, Gislaine, Katiane, Marina, Marcelo, Marissa, Paulo, Priscila, Samantha pela amizade, trocas de conhecimento e bom convívio ao longo deste período.

A Tuane Sampaio pela amizade e auxílio com a técnica de HPLC.

A aluna de IC, Tainara, que me acompanhou em todas as etapas deste trabalho, pela amizade, bom convívio e auxílio na realização dos experimentos.

Aos professores que compuseram a banca da minha qualificação de doutorado Dr. José Eduardo da Silva, Dr. Marcelo Guiachero e Dr. Fernando Spiller pelas excelentes contribuições para a melhoria deste trabalho.

Ao professor Dr. Pedro Augusto C. M. Fernandes (Universidade de São Paulo) pela colaboração na dosagem de melatonina.

Ao professor Dr. Daniel F. Martins (Universidade do Sul de Santa Catarina) pela amizade e pela colaboração na dosagem de TNF- α .

Aos funcionários e professores do PPG Farmacologia da UFSC pelo bom convívio e auxílio durante este período.

A todos os professores que fizeram parte de minha formação e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura oferecida.

À CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“One thing I have learned in a long life: that all our science, measured against reality, is primitive and childlike - and yet it is the most precious thing we have.”

Albert Einstein (1879 – 1955)

RESUMO

A doença de Parkinson (DP) é a segunda doença neurodegenerativa mais comum em humanos, sendo classicamente caracterizada por sintomas motores que estão relacionados à degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal. A etiologia da DP ainda não é completamente compreendida, mas acredita-se que se trata de uma doença multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais influenciam no seu desenvolvimento. Entre os fatores ambientais, a exposição a pesticidas, como o ziram (dimetilditiocarbamato de zinco), vem ganhando destaque. A exposição ocupacional e residencial ao ziram foi recentemente relacionada ao aumento do risco do desenvolvimento da DP. Diferentes sais de dimetilditiocarbamato são amplamente utilizados na agricultura e indústria, expondo a população em geral aos seus efeitos tóxicos. Estes contaminantes ambientais podem atingir estruturas encefálicas através do sistema olfatório, via nervos olfatório e trigêmeo, ou mesmo pela passagem transcelular a partir da mucosa nasal. Neste sentido, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da administração intranasal (i.n.) de dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC), um sal mais solúvel de dimetilditiocarbamato, sobre os comportamentos motores e as alterações bioquímicas relacionadas ao estresse oxidativo/nitrosativo, inflamação e sistema dopaminérgico de camundongos. Além disso, avaliou-se possíveis alterações no sistema melatoninérgico (níveis de melatonina e seus receptores MT1 e MT2) no sistema nervoso central (SNC) de camundongos após a administração i.n. de NaDMDC e o efeito do tratamento com a melatonina sobre as alterações comportamentais e bioquímicas induzidas pelo NaDMDC. A administração de NaDMDC (1 mg/narina/dia) por quatro dias consecutivos induziu déficits motores avaliados no teste do campo aberto, escore neurológico de severidade (ENS) e rotarod até o dia 7 após a última administração da toxina. Os déficits comportamentais no teste do rotarod assim como a redução da massa corporal induzida pelo NaDMDC foram observados até o 35º dia após o término da administração. O tratamento com os fármacos usados no tratamento da DP L-DOPA e apomorfina atenuaram os déficits locomotores induzidos pelo NaDMDC. As alterações comportamentais foram relacionadas ao

aumento inicial dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no bulbo olfatório (BO) e estriado, 2 horas e 24 horas após a última administração, além de dano a membrana celular no estriado, a qual demonstrou ser mais susceptível a toxicidade exercida pelo NaDMDC. A administração de NaDMDC também provocou o aumento de metabólitos do estresse oxidativo/nitrosativo no BO, estriado, córtex pré-frontal e hipocampo, assim como o aumento nos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) no BO e estriado, 24 horas após a última administração de NaDMDC. Com relação ao sistema dopaminérgico, a administração de NaDMDC provocou um aumento no imunocontéudo de tirosina hidroxilase (TH) no estriado, no 1º e 7º dia após a última administração de NaDMDC, e a sua redução no 35º dia. No dia 1 após o tratamento com NaDMDC observou-se uma redução nos níveis de dopamina e o aumento no seu *turnover* no estriado. Com relação ao sistema melatoninérgico, a administração de NaDMDC aumentou os níveis de melatonina no BO, nos dias 1 e 7, e no hipocampo no dia 1. Além disso, observou-se um aumento no dia 1 após o término do tratamento com NaDMDC no imunocontéudo do receptor melatoninérgico MT2 no BO. O tratamento com melatonina (30 mg/kg, via intraperitoneal), 1 h antes de cada administração de NaDMDC, preveniu o aparecimento de déficits motores, perda de massa corporal, alterações do sistema dopaminérgico, assim como, inibiu o aumento de metabólitos do estresse oxidativo/nitrosativo no BO, estriado e córtex pré-frontal dos animais. Em conjunto, estes resultados demonstram que a administração i.n. de NaDMDC provoca alterações comportamentais e bioquímicas em camundongos relacionadas à DP. O presente estudo demonstra de maneira pioneira que o tratamento com a melatonina possui efeitos neuroprotetores frente à toxicidade exercida pelo NaDMDC, o que destaca o potencial terapêutico deste neuro-hormônio em condições de dano neuronal.

Palavras-chave: Doença de Parkinson, dimetilditiocarbamato de sódio, intranasal, vetorização olfatória, melatonina, neuroproteção.

ABSTRACT

Parkinson's disease (PD) is the second most common neurodegenerative disease in humans, being classically characterized by motor symptoms, which are related to the dopaminergic neuronal loss in the nigrostriatal pathway. The primary PD etiology remains unclear, but it is believed to be a multifactorial disease, where the combination of genetic and environmental factors influence its development. Among environmental factors, exposure to pesticides, such as ziram (zinc dimethyldithiocarbamate), has been highlighted. Occupational and residential exposure to ziram has recently been linked to increased risk of PD developing. Different dimethyldithiocarbamate salts are widely used in agriculture and industry, exposing the general population to their toxic effects. These environmental contaminants can target encephalic structures to exert their toxic effects via the olfactory pathway, through olfactory and trigeminal nerves, or even through transcellular passage from nasal mucosa. Therefore, this study aimed to evaluate the effects of intranasal (i.n.) administration of sodium dimethyldithiocarbamate (NaDMDC), a more soluble salt of dimethyldithiocarbamate, on motor function and biochemical changes related to oxidative/nitrosative stress, inflammation and dopaminergic system of mice. In addition, putative NaDMDC-induced alterations on the melatonergic system in the central nervous system (CNS) and the effects of melatonin treatment on changes caused by NaDMDC were also evaluated. I.n. administration of NaDMDC (1 mg/nostril/day) for four consecutive days induced motor deficits addressed in the open field, neurological severity score (NSS) and rotarod tests up to day 7 after the last administration. Behavioral deficits in the rotarod test as well as the reduction of body mass induced by NaDMDC were found to remain significant up to 35th day after the end of its administration. Pharmacological treatment with the anti-parkinsonian drugs L-DOPA and apomorphine improved the locomotor deficits induced by NaDMDC. Behavioral changes were related to the initial increase of reactive oxygen species (ROS) levels in the olfactory bulb (OB) and striatum, 2 hours and 24 hours after the last administration, besides cell membrane damage in the striatum, which proved to be more susceptible to NaDMDC toxicity. The administration of NaDMDC also increased oxidative/nitrosative stress metabolites in OB, striatum, prefrontal

cortex and hippocampus, as well as increased tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels in the BO and striatum, 24 hours after the last NaDMDC administration. Regarding the dopaminergic system, administration of NaDMDC increased striatal tyrosine hydroxylase (TH) immunocontent on the 1st and 7th day after the last administration of NaDMDC, and decreased TH levels in the 35th day. On day 1, there was a reduction in dopamine levels and an increase in dopamine turnover in the striatum. Regarding the melatoninergic system, the administration of NaDMDC increased the OB melatonin levels on days 1 and 7, whereas in the hippocampus only on day 1. In addition, on day 1 after the end of NaDMDC treatment, the immunocontent of melatonin MT2 receptor was increased in the OB. Treatment with melatonin (30 mg/kg intraperitoneally), 1 h before each administration of NaDMDC, prevented the onset of motor deficits, loss of body mass, changes in the dopaminergic system, as well as inhibited the increase of stress oxidative/nitrosative metabolites in OB, striatum and prefrontal cortex in animals. Taken together, these results demonstrate that i.n. NaDMDC administration promotes behavioral and biochemical changes in mice, related to PD in humans. These findings reinforce the relationship of dimethyldithiocarbamate exposure with increased PD development risk, as well as highlight the importance of olfactory vectoring of environmental toxins as a possible access route to the CNS. Finally, we demonstrated for the first time that treatment with melatonin exerts neuroprotective effects against the NaDMDC toxicity, reinforcing the therapeutic potential of this neurohormone in neuronal damage conditions including PD.

Key words: Parkinson's disease, sodium dimethyldithiocarbamate, intranasal, olfactory vectoring, melatonin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de formação dos corpos de Lewy e degeneração dopaminérgica observados na doença de Parkinson.....	37
Figura 2 - Circuito córtico-estriado-tálamo-cortical.....	39
Figura 3 - Alvos das drogas dopaminérgicas na doença de Parkinson.....	41
Figura 4 - Estruturas moleculares de ditiocarbamatos com atividade inibitória do sistema ubiquitina proteossoma.....	53
Figura 5 - Representação esquemática da toxicidade exercida pelo NaDMDC em neurônios dopaminérgicos.....	55
Figura 6 - Esquema do mecanismo hipotético da degeneração dopaminérgica na doença de Parkinson a partir da inalação de toxinas ambientais.....	61
Figura 7 - Vias de distribuição de toxinas na cavidade nasal e sistema nervoso central de roedores.....	66
Figura 8 - Organização geral da região olfatória da cavidade nasal.....	69
Figura 9 - Organização geral e inervação trigeminal da região respiratória da cavidade nasal.....	72
Figura 10 – Diferentes protocolos experimentais usados para a avaliação das alterações comportamentais induzidas pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.....	78
Figura 11 – Ilustração do procedimento utilizado para a administração intranasal de NaDMDC em camundongos.....	84
Figura 12 – Representação do aparato utilizado no teste do campo aberto.....	82

Figura 13 - Aparatos usados para a avaliação do Escore Neurológico de Severidade.....	84
Figura 14 - Aparato do Rotarod.....	86
Figura 15 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC (protocolo 1) sobre a temperatura corporal de camundongos.....	91
Figura 16 – Efeitos do protocolo 1 de administração intranasal de NaDMDC sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.....	92
Figura 17 – Efeitos do protocolo 2 de administração intranasal de NaDMDC sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.....	94
Figura 18 - Efeitos do protocolo 3 de administração intranasal de NaDMDC sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.....	95
Figura 19 – Efeitos da administração intraperitoneal de NaDMDC sobre sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.....	97
Figura 20 – Efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre o imunocontéudo de tirosina hidroxilase no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....	98
Figura 21 – Efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de TNF- α no bulbo olfatório e estriado de camundongos avaliados no sétimo dia após a última administração.....	99
Figura 22 – Efeitos do tratamento com L-Dopa sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.....	102
Figura 23 – Efeitos do tratamento com apomorfina sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.....	105

Figura 24 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....	107
Figura 25 – Efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre o dano a membrana celular no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....	108
Figura 26 – Representação simplificada da síntese de melatonina em pinealócitos.....	125
Figura 27 - Sumário dos mecanismos moleculares associados ao efeito neuroprotetor da melatonina em modelos experimentais in vivo e in vitro da doença de Parkinson.....	129
Figura 28 - Protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito da melatonina exógena sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.....	143
Figura 29 - Protocolo experimental para avaliação do efeito tardio da administração intranasal de NaDMDC e do efeito protetor da melatonina exógena sobre a performance motora e estado neurológico de camundongos.....	145
Figura 30 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de melatonina em diferentes estruturas encefálicas de camundongos.....	152
Figura 31 – Efeitos do tratamento com melatonina sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.....	154
Figura 32 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de 3-nitrotirosina, malondialdeído e 4-hidroxinonenal no bulbo olfatório de camundongos.....	157
Figura 33 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de 3-nitrotirosina,	

malondialdeído e 4-hidroxinonenal no estriado de camundongos.....159

Figura 34 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de TNF- α no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....163

Figura 35 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase e transportador de dopamina no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....164

Figura 36 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....166

Figura 37 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de dopamina, DOPAC e o turnover no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....168

Figura 38 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre a função motora e estado neurológico geral de camundongos.....175

Figura 39 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase e do transportador de dopamina no estriado de camundongos.....177

Figura 40 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no bulbo olfatório e estriado de camundongos.....179

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de severidade.....	85
Tabela 2 - Efeito da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de 3-nitrotirosina, malondialdeído e 4-hidroxinonenal, em diferentes estruturas encefálicas de camundongos.....	160
Tabela 3 - Efeito da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de noradrenalina, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético no bubo olfatório de camundongos.....	169
Tabela 4 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de noradrenalina, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético no estriado de camundongos.....	171

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sumário de estudos comportamentais e neuroquímicos após administração intranasal de contaminantes ambientais em diferentes espécies animais.....	62
Quadro 2 - Sumário de estudos demonstrando o efeito neuroprotetor da melatonina em modelos experimentais da doença de Parkinson.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 3-NT: 3-nitrotirosina
4-HNE: 4-hidroxinonenal
5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético
6-OHDA: 6-hidroxidopamina
AANAT: aril-alquil-N-acetiltransferase
AC: adenilil ciclase
AFMK: N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina
ALDH: aldeído desidrogenase
AMC: área motora cingulada
AMK: N1-acetil-5-metoxiquinuramina
AMPA: Ácido α -Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (do Inglês: *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*)
AMPc: monofosfato cíclico de adenosina (do Inglês: *adenosine monophosphate*)
AMS: área motora suplementar
ANOVA: análise de variância
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASMT: acetilserotonina-O-metiltransferase
ATP: trifosfato de adenosina (Inglês: *adenosine triphosphate*)
Bax: proteína X associada a Bcl2
BHE: barreira hemato-encefálica
BO: bulbo olfatório
BSA: albumina de soro bovino (do Inglês: *bovine serum albumin*)
CEUA: Comissão de Ética para o uso de animais
CIATs: Centros de Informação e Assistência Toxicológica
CM: núcleo centromediano
COMT: catecol-O-metiltransferase
COX: ciclo-oxigenase
CPM: córtex pré-motor
CREB: elemento de resposta ao AMP cíclico (do Inglês: *cAMP responsive element-binding*)
DA: dopamina

DARP32: fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc (do Inglês: *dopamine- and cAMP regulated neuronal phosphoprotein*)
DAMPs: padrões moleculares associados ao dano (do Inglês: *damage-associated molecular patterns*)
DAT: transportador de dopamina (do Inglês: *dopamine transporter*)
DCAA: descarboxilase de aminoácidos aromáticos
DCF: 2'-7'-diclorofluoresceína
DCFH: 2'-7'-diclorodi-hidrofluoresceína
DDT: diclorodifeniltricloroetano
DMDC: Dimetilditiocarbamato
DOPAC: ácido 3,4-diidroxifenilacético
DOPAL: 3,4-diidroxifenil acetaldeído
DP: doença de Parkinson
EDTA: ácido etileno-diamino-tetra-acético
ELISA: Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (do Inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*)
ENS: escore neurológico de severidade
EPA: Agência de Proteção Ambiental (do Inglês: *Environmental Protection Agency*)
ERNs: espécies reativas de nitrogênio
EROs: espécies reativas de oxigênio
Ferbam: dimetilditiocarbamato de ferro
GDNF: fator neurotrófico derivado da glia
GPCRs: receptores acoplados a proteína G (do Inglês: *G protein-coupled receptors*)
GPi: segmento interno do Globo Pálido
GPx: glutationa peroxidase
GSH: glutationa reduzida
GSSG: glutationa oxidada
H₂DCFDA: 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína
H₂O₂: peróxido de hidrogênio
HEK: rim embrionário humano (do Inglês: *Human Embryonic Kidney*)
HIOMT: hidroxil-indol-O-metiltransferase
i.c.v.: intracerebroventricular

i.n.: intranasal
i.p.: intraperitoneal
IAPs: proteínas inibidoras de apoptose
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- β 1b: interferon- β 1b
IGF-I: fator de crescimento semelhante a insulina-tipo I (do Inglês: *Insulin-like Growth Factor-I*)
iNOS: óxido nítrico sintase induzível
IP: Iodeto de Propídeo
JO: junções ocludentes
KRB: Krebs-Ringer bicarbonato
LCR: Líquido cefalorraquidiano
L-DOPA: L-diidroxifenilalanina
M1: córtex motor primário
Mancozebe: etileno-bisditiocarbamato de manganês
MAO: monoamina oxidase
MAO-B: monoamina oxidase B
MAPK: proteína cinase induzida por mitógeno
MDA: malondialdeído
Metam: N-metilditiocarbamato de sódio
Metiram: amoniato-etileno-bisditiocarbamato de zinco
MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiperidina
MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina
NaDMDC: dimetilditiocarbamato de sódio
NCX3: trocador sódio-cálcio tipo 3 (do Inglês: *sodium-calcium exchanger 3*)
NF κ -B: fator nuclear *kappa*-B
NMDA: N-metil-D-aspartato
NPP: núcleo pedúnculo pontino
NST: núcleo subtalâmico
OH \cdot : radical hidroxila
ONOO \cdot : peroxinitrito
ONS: óxido nítrico sintase

PARA: Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos

PGE2: prostaglandina E2

PKA: proteína quinase A (do Inglês: *protein kinase A*)

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto (do Inglês: *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

Propinebe: propileno-bisditiocarbamato de zinco

PVDF: fluoreto de polivinilideno (do Inglês: *Polyvinylidene Fluoride*)

RC: razão de chances

RNAm: RNA mensageiro

s.c.: subcutânea

SINAN: Sistema de Notificação de Agravos de Notificação

SINITOX: Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

SN: substância negra

SNC: sistema nervoso central

SNpc: parte compacta da substância negra

SNpr: parte reticulada da substância negra

SOD: superóxido dismutase

TH: tirosina hidroxilase

TNF- α : fator de necrose tumoral- α (do Inglês: *Tumor Necrosis Fator- α*)

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

UPS: Sistema Ubiquitina Proteossoma (do Inglês: *Ubiquitin-Proteosome System*)

v.o.: via oral

VA-VL: núcleo ventral anterior-ventral lateral

Ziram: dimetilditiocarbamato de zinco

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	33
1. CAPÍTULO 1: PAPEL DOS PESTICIDAS NA ETIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON – A EXPOSIÇÃO AO DIMETILDITIOCARBAMATO COMO FATOR DE RISCO	35
1.1 INTRODUÇÃO	35
1.1.1 Doença de Parkinson.....	35
1.1.2 Epidemiologia da doença de Parkinson.....	43
1.1.3 Etiopatologia da doença de Parkinson.....	44
1.1.4 Pesticidas como fator de risco para a doença de Parkinson	46
1.1.4.1 Dimetilditiocarbamato (DMDC)	51
2. CAPÍTULO 2: EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NADMDMDC EM CAMUNDONGOS	59
2.1 INTRODUÇÃO	59
2.1.1 Vetorização olfatória na doença de Parkinson.....	59
2.1.2 Possíveis vias de transporte de substâncias da cavidade nasal para o sistema nervoso central.....	66
2.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	75
2.3 OBJETIVOS	75
2.3.1 Objetivo geral	75
2.3.2 Objetivos específicos	75
2.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.4.1 Protocolos experimentais	77
2.4.2 Animais.....	80
2.4.3 Drogas	81

2.4.4 Administração intranasal de NaDMDC	81
2.4.5 Avaliação da temperatura corporal.....	82
2.4.6 Testes comportamentais.....	82
2.4.6.1 Campo aberto	82
2.4.6.2 Escore neurológico de severidade (ENS).....	83
2.4.6.3 Rotarod.....	85
2.4.7 Análises ex vivo	86
2.4.7.1 <i>Western blotting</i>	86
2.4.7.2 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima.....	87
2.4.7.3 Ensaio de dano a membrana celular e medida da produção de espécies reativas de oxigênio.....	88
2.4.7.3.1 <i>Preparação das fatias</i>	88
2.4.7.3.2 <i>Ensaio de dano a membrana celular</i>	88
2.4.7.3.3 <i>Medida dos níveis de EROs</i>	89
2.4.8 Análise estatística.....	89
2.5 RESULTADOS.....	91
2.5.1 A administração intranasal de NaDMDC induz hipotermia e déficits motores em camundongos	91
2.5.2 A administração de NaDMDC por via sistêmica não prejudica a função motora e estado neurológico de camundongos.....	96
2.5.3 A administração intranasal de NaDMDC provoca aumento no imunocontéudo de tirosina hidroxilase no estriado de camundongos	98
2.5.4 O tratamento com L-DOPA e apomorfina atenua os déficits na função motora e estado neurológico induzidos pela administração intranasal do NaDMDC	99

2.5.5 A administração intranasal de NaDMDC induz aumento no estresse oxidativo e dano celular em estruturas encefálicas de camundongos	106
2.6 DISCUSSÃO	110
2.7 CONCLUSÕES	119
3 CAPÍTULO 3: EFEITOS DO TRATAMENTO COM MELATONINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NADMDC	121
3.1 INTRODUÇÃO	121
3.1.1 Melatonina.....	121
3.1.2 Atividade neuroprotetora da melatonina.....	126
3.1.3 Evidências experimentais da atividade neuroprotetora da melatonina na doença de Parkinson	128
3.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	140
3.3 OBJETIVOS	140
3.3.1 Objetivo geral	140
3.3.2 Objetivos específicos	140
3.4 MATERIAL E MÉTODOS.....	142
3.4.1 Protocolos experimentais	142
3.4.2 Animais.....	145
3.4.3 Drogas	145
3.4.4 Administração intranasal de NaDMDC	146
3.4.5 Testes comportamentais.....	146
3.4.5.1 Campo aberto.....	146
3.4.5.2 Escore neurológico de severidade.....	146
3.4.5.3 Rotarod.....	146
3.4.6 Análises <i>ex vivo</i>	146

3.4.6.1 <i>Western blotting</i>	146
3.4.6.2 Dot blot	147
3.4.6.3 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima	147
3.4.6.3.1 <i>Fator de Necrose Tumoral-α</i>	147
3.4.6.3.2 <i>Dosagem dos níveis de melatonina</i>	148
3.4.6.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica	148
3.4.7 Análise estatística	149
3.5 RESULTADOS	151
3.5.1 A administração intranasal de NaDMDC aumenta os níveis de melatonina no bulbo olfatório e hipocampo de camundongos	151
3.5.2 O tratamento com melatonina previne os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos	153
3.5.3 O tratamento com melatonina protege contra o estresse oxidativo/nitrosativo induzido pela administração intranasal de NaDMDC em estruturas encefálicas de camundongos.	155
3.5.4 O tratamento com melatonina protege contra o aumento nos níveis de TNF induzidos pela administração intranasal de NaDMDC no bulbo olfatório e estriado de camundongos..	162
3.5.5 O tratamento com melatonina inibe o aumento no imunoconteúdo de tirosina hidroxilase no estriado induzido pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos	163

3.5.6 A administração intranasal de NaDMDC induz o aumento no imunoconteúdo do receptor melatoninérgico MT2 no bulbo olfatório de camundongos	165
3.5.7 A administração intranasal de NaDMDC provoca uma redução nos níveis de dopamina no estriado de camundongos.....	166
3.5.8 O tratamento com melatonina protege contra déficit motor tardio induzido pela administração intranasal de NaDMDC	173
3.5.9 O tratamento com melatonina protege contra a redução tardia no imunoconteúdo de tirosina hidroxilase induzida pela administração intranasal de NaDMDC	176
3.5.10 A administração intranasal de NaDMDC e o tratamento com melatonina não influenciam de forma tardia o imunoconteúdo de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no bulbo olfatório e estriado de camundongos	178
3.6 DISCUSSÃO	180
3.7 CONCLUSÕES	187
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	189
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	191

APRESENTAÇÃO

Este trabalho está dividido em 3 capítulos. No capítulo 1, é apresentada uma revisão da literatura sobre o envolvimento dos pesticidas na etiopatologia da doença de Parkinson, com destaque para os dimetilditiocarbamatos. O capítulo 2 apresenta a avaliação da toxicidade da administração intranasal de dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC) em camundongos. No capítulo 3, está descrita a avaliação da atividade neuroprotetora da melatonina frente aos déficits induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.

1. CAPÍTULO 1: PAPEL DOS PESTICIDAS NA ETIOPATOLOGIA DA DOENÇA DE PARKINSON – A EXPOSIÇÃO AO DIMETILDITIOCARBAMATO COMO FATOR DE RISCO

1.1 INTRODUÇÃO

1.1.1 Doença de Parkinson

A doença de Parkinson (DP) foi descrita originalmente pelo médico inglês James Parkinson (1755-1824) no seu trabalho intitulado “Ensaio sobre a paralisia agitante” em 1817. Neste documento foram descritos os sintomas motores de seis casos clínicos. Em seus relatos, James Parkinson descreveu que os sentidos e o intelecto destes pacientes estavam intactos (GOETZ, 2011). Posteriormente, o médico francês Jean-Martin Charcot (1825-1893), através de seu trabalho no Hospital de La Salpêtrière em Paris, fez diversas contribuições à descrição da DP, incluindo a renomeação da doença em homenagem a James Parkinson, a introdução do primeiro tratamento baseado na utilização de anticolinérgicos e o estabelecimento dos sinais cardinais da doença: rigidez, bradicinesia e tremor de repouso. Além disso, Charcot realizou a distinção entre a DP e a Esclerose Múltipla, dentre outras patologias caracterizadas pelo tremor (TEIVE, 1998; GOETZ, 2011).

Em 1895, Edouard Briassaud formulou a hipótese de que a substância negra seria a principal estrutura do sistema nervoso central (SNC) afetada na DP. Isto só foi confirmado por Constantin Trétiakoff em 1919, em sua tese de doutorado. Neste estudo, Trétiakoff realizou o estudo *post-mortem* do encéfalo de 54 pacientes e verificou uma acentuada perda dos neurônios pigmentados da substância negra, com o aparecimento de tumefação celular, degeneração granular e alterações neurofibrilares. As células sobreviventes apresentavam depósitos neurais típicos, que Trétiakoff nomeou de corpos de Lewy em reconhecimento ao neuropatologista alemão Friedrich Heinrich Lewy (1885-1950), que foi quem primeiramente identificou estas inclusões citoplasmáticas no núcleo dorsal do nervo vago e na

substância inominada de pacientes parkinsonianos (PARENT; PARENT, 2010).

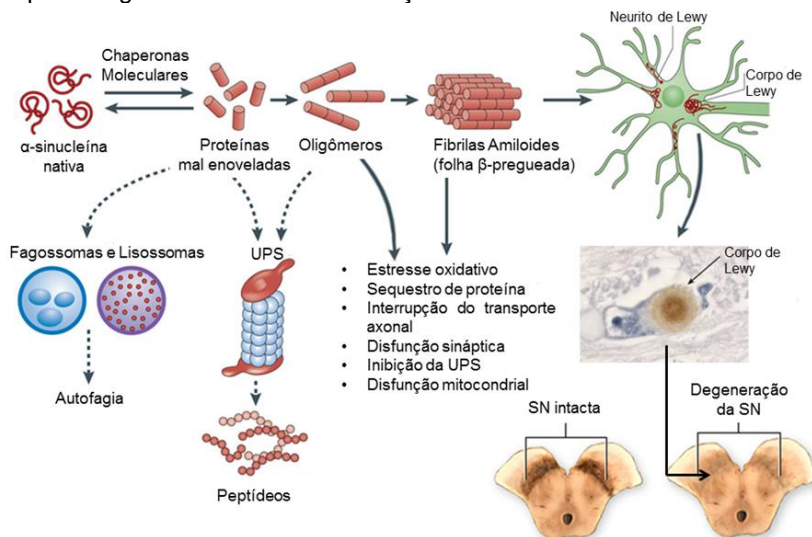
As observações feitas por Trétiakoff são consideradas até os dias atuais como as principais características neuropatológicas da DP. A morte de neurônios dopaminérgicos localizados na parte compacta da substância negra (SNpc), que enviam projeções para os gânglios da base, provoca uma redução nos níveis de dopamina no estriado. Esta alteração neuropatológica é a principal responsável pelos sintomas motores da DP (HIRSCH; GRAYBIEL; AGID, 1988). A morte neuronal é acompanhada pelo aparecimento de corpos de Lewy, compostos principalmente pelo acúmulo das proteínas α -sinucleína e ubiquitina. Estes acúmulos podem surgir devido à falhas nos mecanismos de degradação proteica como a autofagia e o sistema ubiquitina proteossoma (UPS, do Inglês: *Ubiquitin-Proteosome System*) (Figura 1) (SPILLANTINI et al., 1997; BLANDINI et al., 2000).

O farmacologista sueco Arvid Carlsson, no final da década de 1950, foi o primeiro a demonstrar que a dopamina era um neurotransmissor e não somente um metabólito precursor na síntese de noradrenalina (CARLSSON, 1959a; b). Posteriormente, Hornykiewicz e colaboradores demonstraram uma acentuada redução nos níveis de dopamina no estriado de pacientes parkinsonianos (para revisão ver: HORNYKIEWICZ, 2006; 2010). Carlsson demonstrou também que a administração de reserpina em coelhos promove uma depleção nos níveis de dopamina no estriado, levando à hipolocomoção nestes animais, que foi revertida pela administração da L-diidroxifenilalanina (L-DOPA), precursor da dopamina (CARLSSON, 1959b). Posteriormente, o médico grego George Cotzias (1918-1977) obteve bons resultados na remissão dos sintomas motores de pacientes Parkinsonianos utilizando a L-DOPA (YERAGANI et al., 2010; GOETZ, 2011).

Os neurônios dopaminérgicos da SNpc fazem parte de um circuito em alça, o circuito córtico-estriado-tálamo-cortical (Figura 2 A). Este circuito está envolvido na facilitação de movimentos voluntários e é dividido em três vias principais: direta, indireta e hiperdireta. A via direta reforça a ativação talâmica, levando ao envio de projeções excitatórias ao córtex, facilitando o movimento - esta via é estimulada pela ativação de receptores dopaminérgicos do tipo D1 no estriado. Por outro lado, a via indireta inibe as projeções talâmicas excitatórias, inibindo o movimento - esta via é inibida pela ativação de receptores D2 no

estriado. Já a via hiperdireta, que envia projeções diretamente do córtex para o núcleo subtalâmico (NST), tem um efeito supressor na ação motora. A redução da inervação dopaminérgica proveniente da SNpc no estriado, como ocorre na DP, leva a uma redução da ativação da via direta, bem como da inibição da via indireta, o que provoca uma ativação excessiva do segmento interno do globo pálido (GPI) e parte reticulada da substância negra (SNpr), levando à inibição do tálamo, resultando em déficits motores (Figura 2B) (BLANDINI et al., 2000; CUNHA, 2012).

Figura 1 - Processo de formação dos corpos de Lewy e degeneração dopaminérgica observados na doença de Parkinson.



Legenda: Falhas nos mecanismos de degradação proteica levam ao acúmulo de proteínas como a α -sinucleína e a ubiquitina. Este acúmulo pode ocasionar a formação de neuritos e corpos de Lewy, culminando na degeneração neuronal da substância negra (SN) característico da doença de Parkinson. UPS: Sistema ubiquitina-proteossoma.

Fonte: Adaptado de Irwin e colaboradores (2013).

Os receptores dopaminérgicos envolvidos nesta via neuronal são da superfamília de receptores acoplados a proteína G (GPCRs, do Inglês: *G protein-coupled receptors*). Os receptores do subtipo D1 (via direta) são acoplados a proteínas $G\alpha_s$, que

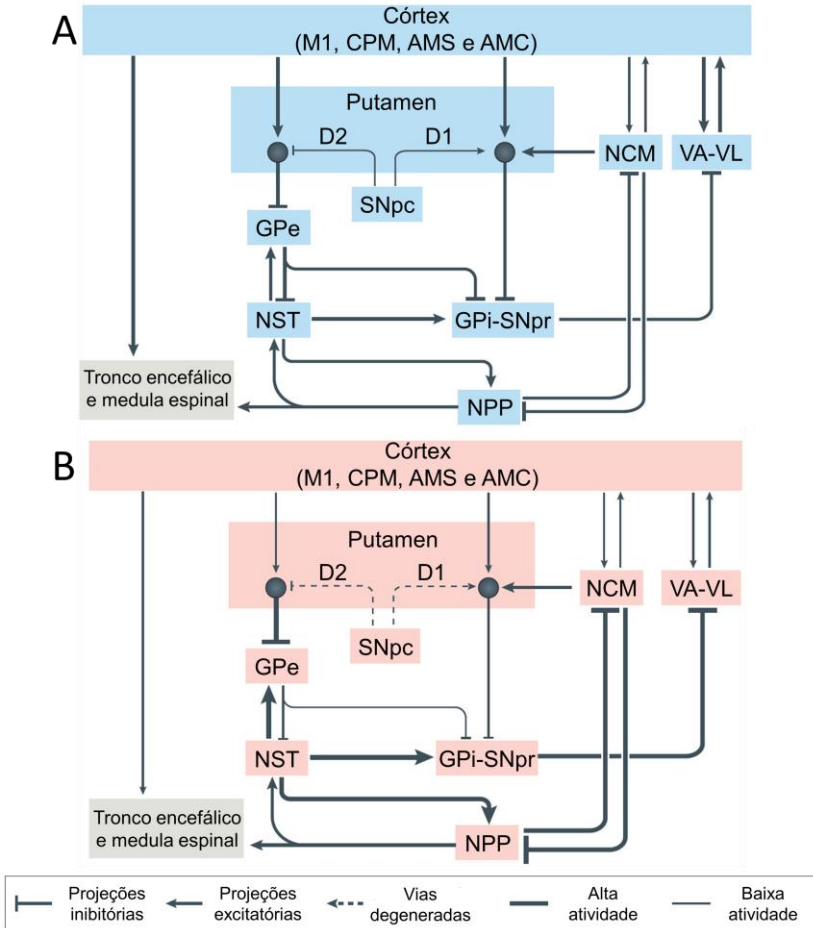
estimulam a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC, do Inglês: *adenosine monophosphate*) pela enzima adenilil ciclase (AC) e são exclusivamente pós-sinápticos. Os receptores D2 (via indireta) são acoplados a proteínas $G\alpha_{i/o}$, inibindo a AC e reduzindo os níveis de AMPC, e podem ser pré- e pós-sinápticos. A ativação dos receptores dopaminérgicos leva a modulação da atividade de diferentes vias intracelulares, mas destaca-se a regulação da atividade da enzima proteína quinase A (PKA, do Inglês: *protein kinase A*) e, por consequência, de seus substratos, como CREB, DARP-32 e receptores ionotrópicos de glutamato (AMPA e NMDA) (JABER et al., 1996; BEAULIEU ; GAINETDINOV, 2011).

O diagnóstico da DP é realizado com base no aparecimento da tríade: rigidez, bradicinesia e tremor de repouso, além de boa resposta ao tratamento com L-DOPA. Os pacientes parkinsonianos somente desenvolvem os sintomas motores, permitindo o diagnóstico clínico, após o processo degenerativo atingir estágios avançados. Nesta condição, aproximadamente 60-70% dos neurônios dopaminérgicos da SNpc encontram-se degenerados e os níveis de dopamina no estriado sofrem uma redução de 70-80% (BRAAK et al., 2004). Este fato pode ser responsável pela baixa efetividade clínica de diversas drogas e agentes neuroprotetores testados para o tratamento da DP. Devido ao diagnóstico em vida da DP ser clínico, atualmente, a histopatologia realizada na autópsia é a única forma de diagnóstico definitivo (GELB; OLIVER; GILMAN, 1999; JANKOVIC, 2008; POSTUMA et al., 2015).

O tratamento da DP tem sido focado na terapia de reposição dopaminérgica desde a década de 1960 com o uso da L-DOPA. Embora esta terapia promova uma melhora temporária nos sintomas motores, não interfere na progressão da doença, além de ocorrer uma redução na eficácia com o decorrer do tempo de utilização (ALLAIN; BENTUE-FERRER; AKWA, 2008). Atualmente, embora a L-DOPA continue sendo o “padrão ouro” para o tratamento da DP, a abordagem farmacológica inclui fármacos que aumentem a transmissão dopaminérgica atuando de forma pré- ou pós-sináptica, como apresentado na Figura 3 (POEWE et al., 2017). Ainda, o tratamento crônico da DP com estes fármacos leva ao surgimento de um grande número de efeitos colaterais, incluindo movimentos involuntários anormais

(discinesias), flutuações do tipo “liga-desliga”, psicoses, entre outros (AHLKOG; MENTER, 2001; POEWE et al., 2017).

Figura 2 - Circuito córtico-estriado-tálamo-cortical.

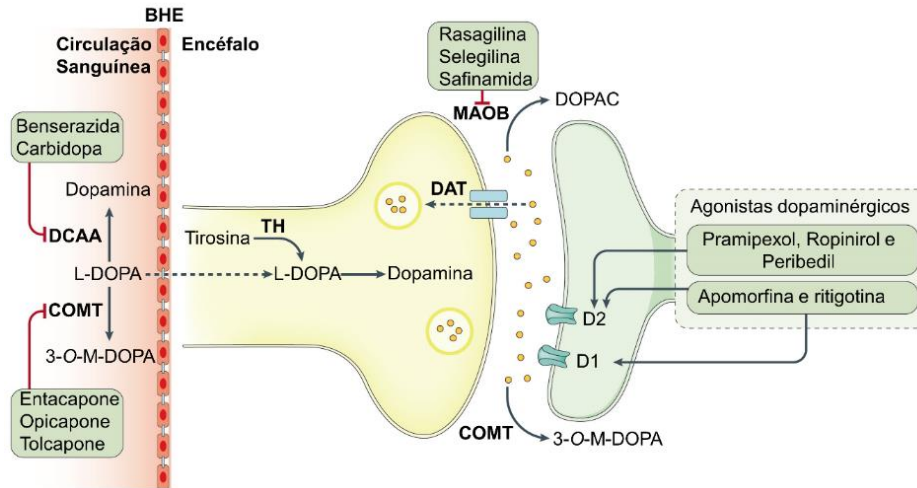


Legenda: Circuito córtico-estriado-tálamo-cortical. Em condições fisiológicas (A) os neurônios dopaminérgicos da parte compacta da substância negra (SNpc) ativam os neurônios estriatais que expressam receptores D1, da via direta, e inibem os neurônios estriatais que expressam receptores D2, da via indireta. Após ser ativada pela SNpc e pelo córtex, a via direta provoca a inibição do globo pálido interno (GPi) e da parte reticulada da substância negra (SNpr). Por outro lado, a ativação da via indireta pelo córtex (e inibição, em menor escala, pela SNpc), causa a inibição do globo pálido externo, o qual inibe o núcleo subtalâmico (NST) e o GPi-SNpr. Em conjunto, essa comunicação leva a uma redução da inibição do tálamo.

Continuação da legenda da Figura 2: Como o tálamo ativa o córtex motor diretamente, pode ser concluído que um aumento da atividade da SNpc pode promover a atividade motora. Entretanto, na Doença de Parkinson (B) a degeneração da SNpc reduz a ativação da via direta e a inibição da via indireta. Esse desequilíbrio estriatal irá provocar um aumento da ativação do GPi-SNpr, mediado pelo NST, além de uma redução da inibição que era realizada pelo GPe. Este evento leva a forte inibição do tálamo, resultando na menor ativação do córtex motor. Assim, a redução da transmissão dopaminérgica da SNpc para o estriado leva a redução da atividade motora. CM, núcleo centromediano; AMC, área motora cingulada; M1, córtex motor primário; CPM, córtex pré-motor; NPP, núcleo pedúnculo pontino; AMS, área motora suplementar; VA-VL, núcleo ventral anterior-ventral lateral.

Fonte: Przedborski (2017).

Figura 3 - Alvos das drogas dopaminérgicas na doença de Parkinson.



Legenda: As drogas que atuam de maneira pré-sináptica incluem a L-DOPA em combinação com inibidores periféricos das enzimas descarboxilase de aminoácidos aromáticos (DCAA) e catecol-O-metiltransferase (COMT). Os inibidores da enzima monoamina oxidase B (MAO-B) aumentam a disponibilidade de dopamina na sinapse. Os agonistas dopaminérgicos atuam através da ativação direta dos receptores dopaminérgicos de maneira pós-sináptica. A seta pontilhada da circulação sanguínea para o encéfalo representa o transporte da L-DOPA pela barreira hematoencefálica (BHE). A seta pontilhada através do transportador de dopamina (DAT, do Inglês: dopamine transporter) demonstra a recaptação de dopamina da fenda sináptica. 3-O-M-DOPA, 3-O-Metil-DOPA; D1, receptor dopaminérgico D1; D2, receptor dopaminérgico D2; DOPAC, ácido 3,4, dioxi-fenilacético; TH, tirosina hidroxilase.

Fonte: Poewe e colaboradores (2017).

Atualmente, sabe-se que o processo degenerativo que leva ao desenvolvimento da DP inicia-se muitos anos antes do aparecimento dos sintomas motores, atingindo outras áreas cerebrais como estruturas olfatórias anteriores, núcleo motor dorsal do vago, núcleo dorsal da rafe, *locus coeruleus*, sistema nervoso autônomo, hipocampo e o córtex cerebral. Além disso, envolve diferentes sistemas de neurotransmissores como o colinérgico, adrenérgico e serotoninérgico. A degeneração destas vias pode levar ao desenvolvimento de sintomas não motores da DP, como: hiposmia, déficits de memória, distúrbios do sono, distúrbios gastrointestinais, transtornos de ansiedade e depressão. Estes sintomas podem se manifestar antes dos sintomas motores e são pouco responsivos à terapia dopaminérgica utilizada atualmente no tratamento da DP (para revisão ver BRAAK et al., 2004).

1.1.2 Epidemiologia da doença de Parkinson

A DP é a segunda doença neurodegenerativa relacionada à idade mais comum em humanos, ficando atrás apenas da doença de Alzheimer. O envelhecimento é o principal fator relacionado com o desenvolvimento da DP, sendo que a idade média para o início da doença é de 60 anos, embora 10% dos casos ocorram antes dos 45 anos (MAYEUX, 2003; LEES; HARDY; REVESZ, 2009). A expectativa de vida após o diagnóstico da DP é em média de 15 anos, sendo a pneumonia a principal causa de morte nestes pacientes (KATZENSCHLAGER et al., 2008).

A prevalência da DP é de aproximadamente 0,3% na população mundial e aumenta de acordo com a idade, chegando a 1-2% em pessoas com mais de 60 anos (MAYEUX, 2003). Neste sentido, o estudo de Rijk e colaboradores (2000) demonstrou que a prevalência da DP na Europa era de 0,6% na faixa etária de 65-69 anos, aumentando para 2,6% em indivíduos entre 85 e 90 anos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (IBGE, 2000), existem aproximadamente 222 mil parkinsonianos no Brasil, sendo esperado um aumento no número de pacientes acometidos por esta doença nos próximos anos em virtude do fenômeno de envelhecimento populacional. Dados do IBGE mostram que a expectativa de vida do brasileiro, que era de 71,2 anos em 2003, passou para 74,9 anos em 2013 e, ainda, projeções indicam que este índice será de aproximadamente 89

anos em 2050. Além disso, em 2013, a população brasileira com 60 anos ou mais já era estimada em 13,2% do total (IBGE, 2015).

Estudos apontam que a taxa de incidência homem/mulher da DP pode variar entre 1,3 e 2,0. Neste sentido, nos Estados Unidos o risco da DP proporcional ao tempo de vida é de 2% para os homens e 1,3% para as mulheres, em indivíduos de 40 anos. Ainda, a prevalência ajustada pela idade parece ser menor na África em comparação a Europa, Ásia e Américas. No entanto, os dados sobre a incidência da DP baseados na raça ou etnia são limitados e inconclusivos (ASCHERIO ; SCHWARZSCHILD, 2016).

1.1.3 Etiopatologia da doença de Parkinson

O fator etiológico primário da DP permanece desconhecido. Porém, atualmente acredita-se que exista uma interação entre fatores ambientais e genéticos caracterizando-a como uma doença multifatorial. Neste sentido, mutações nos genes PARK2 e PINK1, os quais codificam a expressão das proteínas parkina e PINK1, respectivamente, estão relacionadas ao aparecimento de um parkinsonismo hereditário recessivo de início precoce (antes dos 45 anos). Por outro lado, mutações nos genes SNCA e LRRK2, os quais codificam a expressão das proteínas alfa-sinucleína e LRRK2 (proteína rica em repetições de leucina cinase 2), respectivamente, podem dar origem a DP hereditária dominante de início tardio (depois dos 60 anos). Ademais, mutações nos genes PARK2 e LRRK2, idênticas àquelas relacionadas à DP hereditária, foram identificadas em indivíduos com DP idiopática, que não apresentavam histórico familiar da doença. Mutações em diversos outros genes tem demonstrado relação com o aparecimento de diferentes fenótipos da DP (TRINH; FARRER, 2013; PRZEDBORSKI, 2017).

O forte componente genético da DP de início precoce foi demonstrado por Tanner e colaboradores (1999). Neste estudo, as taxas de concordância encontradas para gêmeos monozigóticos e dizigóticos foram similares, 16% e 11%, respectivamente, quando a idade no diagnóstico da DP não foi levada em consideração. Entretanto, quando avaliou-se somente indivíduos diagnosticados antes dos 50 anos, a taxa de concordância passou para 100% em gêmeos monozigóticos e 16% em dizigóticos (TANNER et al., 1999).

A intoxicação aguda por substâncias também pode levar ao aparecimento de diferentes fenótipos de parkinsonismo. Assim, a administração de alguns fármacos como antipsicóticos (haloperidol, risperidona, etc), anti-eméticos (metoclopramida) e bloqueadores de canais de cálcio (flunarizina) pode levar ao aparecimento de parkinsonismo farmacológico transitório, geralmente pouco responsivo ao tratamento com L-DOPA (MACKAY, 1981; SHIN; CHUNG, 2012). Além disso, estudos demonstraram que a intoxicação de índios Chamorro do território norte americano de Guam, na Micronésia, pelo consumo de sementes de *Cycas micronesica*, pode levar ao aparecimento de um complexo de demência-parkinsonismo irreversível (KURLAND, 1988).

Em 1983, Langston e colaboradores publicaram a descrição de quatro pacientes jovens (entre 26 e 46 anos), que apresentavam um quadro clínico de parkinsonismo responsivo à L-DOPA. Além dos sintomas motores, os indivíduos também apresentavam alguns sintomas não motores da DP, como seborreia facial e déficits leves em funções cognitivas. Estes pacientes possuíam em comum o fato de serem usuários de um tipo de heroína sintética, por via intravenosa. Os sintomas apresentados foram atribuídos a toxicidade de um subproduto da síntese da heroína, o 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), o qual poderia estar levando a uma degeneração de neurônios dopaminérgicos na SNpc (LANGSTON et al., 1983). Posteriormente, demonstrou-se que o metabólito ativo do MPTP, o 1-metil-4-fenilpiperidina (MPP⁺), possui a capacidade de ser transportado ativamente para o interior dos neurônios dopaminérgicos, onde exerce seus efeitos tóxicos, levando a morte destes neurônios (LANGSTON, 2017). Na sequência, o desenvolvimento de modelos animais utilizando o MPTP tornaram-se valiosas ferramentas para o estudo dos sintomas motores e não motores, assim como modelo para a investigação de novas drogas paliativas e neuroprotetoras para o tratamento da DP (DI MONTE, 2003; PREDIGER et al., 2012a).

Fatores hereditários e intoxicações agudas parecem ser a principal causa de aproximadamente 10% dos casos da DP; enquanto 90% dos casos da DP são classificados como DP idiopática ou esporádica, que ocorre em idade avançada e pode estar ligada a interação dos indivíduos com o meio ambiente (DOTY, RICHARD L., 2012). Neste sentido, estudos

demonstraram que a prevalência da DP é similar entre diferentes grupos étnicos vivendo no mesmo local, mas pode variar em indivíduos de mesmos grupos étnicos vivendo em locais diferentes (BROWN et al., 2006). Diversos fatores têm sido relacionados com o aumento do risco de desenvolvimento da DP, como: consumo de estrógenos pós-menopausa, de laticínios e de metanfetamina, traumatismo craniano, melanoma, diabetes tipo 2, viver em área rural e exposição a pesticidas (DOTY 2012; ASCHERIO; SCHWARZSCHILD, 2016). A exposição a pesticidas como fator de risco para a DP tem maior relevância para este trabalho e será discutida mais detalhadamente nas próximas seções.

1.1.4 Pesticidas como fator de risco para a doença de Parkinson

A necessidade da utilização de pesticidas surgiu concomitantemente com o advento da agricultura. Os primeiros registros da utilização de pesticidas pela humanidade datam de 2500 a.c., com o uso de enxofre pelos Sumérios para o controle de insetos e ácaros (ASPELIN, 2003). Durante muito tempo houve pouca evolução no desenvolvimento de pesticidas para o controle de pragas. Entretanto, a partir de 1930, quando muitos países enfrentaram escassez de alimentos, os esforços se voltaram para o aumento da produtividade das principais culturas de grãos (arroz, trigo e milho) na chamada “revolução verde” (PIMENTEL, 1996). O primeiro pesticida moderno foi o diclorodifeniltricloroetano (DDT) sintetizado ainda em 1879, mas que teve sua atividade inseticida descoberta apenas em 1939 pelo químico suíço Paul Hermann Müller, o que lhe rendeu o prêmio Nobel em medicina em 1948. O DDT foi disponibilizado para uso pela população em 1945 e iniciou uma nova era no controle de pragas na agricultura. A partir de então, diversos outros pesticidas foram sintetizados, como: organofosforados, ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), fungicidas orgânicos à base de metal, entre outros (ASPELIN, 2003).

Diversos são os fatores que levam à necessidade do uso de pesticidas para o controle de pragas, tais como desenvolvimento de culturas atrativas com grande concentração de açúcares, monoculturas com grandes áreas cultivadas, incursão de cultivos em áreas ocupadas por pragas até então desconhecidas, mobilidade de pessoas e comércio, transportando pragas para

lugares onde não existem controles/predadores naturais, adaptações de pragas às formas de controle desenvolvidas pelo homem, entre outros (ASPELIN, 2003). Estes fatores, em conjunto com a necessidade constante de aumento da produção alimentícia levaram ao aumento contínuo da utilização de pesticidas na agricultura. Em 2012 estima-se que foram utilizados cerca de 2,7 milhões de toneladas de pesticidas no mundo, 500 mil toneladas utilizadas somente nos EUA (EPA, 2017a).

Entre 1975 e 2008 o Brasil figurava entre os seis maiores mercados consumidores de pesticidas, mas foi a partir de 2008 que assumiu a liderança desse mercado e atualmente é responsável por aproximadamente 20% do consumo total de pesticidas no mundo. Somente em 2009, a venda de pesticidas no Brasil somou 7,12 bilhões de dólares, enquanto o segundo maior consumidor, os EUA, movimentaram 6,6 bilhões de dólares nesse mercado (IBAMA, 2010).

Atualmente, existem mais de 1000 ingredientes ativos de pesticidas comercializados no mundo. No Brasil, 381 ingredientes ativos estão atualmente aprovados; 130 empresas produzem aproximadamente 2400 diferentes produtos comerciais com estes ingredientes (ALBUQUERQUE et al., 2016). Embora estes produtos tragam um grande benefício para o ser humano, através da proteção dos alimentos contra pragas, o contato com estas substâncias traz prejuízos à saúde humana através de intoxicações agudas, ou ainda, aumentando o risco do desenvolvimento de doenças crônicas através da exposição ambiental e/ou ocupacional. Tendo em vista que estas substâncias foram criadas para serem tóxicas para organismos vivos, a probabilidade de que sejam tóxicas também para seres humanos e outros animais é muito grande (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017).

Estudos em países em desenvolvimento demonstraram taxas de intoxicação aguda por agrotóxicos de 18,2 a cada 100.000 trabalhadores que foram expostos a pesticidas. Os motivos de intoxicação variam, mas o principal é a ingestão por tentativa de suicídio. A ONU reconhece o auto-envenenamento por pesticidas como o principal método de suicídio no mundo, sendo que as taxas mais altas estão em países asiáticos (WHO, 2012).

No Brasil, os dados sobre intoxicação por pesticidas são controversos, no entanto, o Sistema Nacional de Informações

Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) registrou 62 mil intoxicações por pesticidas de uso agrícola no período de 1999 a 2009, uma média de 5600 casos por ano. Neste intervalo de dez anos, foram registrados 1876 casos de morte por intoxicação por pesticidas (BOMBARDI, 2011; SINITOX, 2017). Os últimos dados disponibilizados pelo SINITOX são do ano de 2013, onde foram registrados 1907 casos de intoxicação humana por pesticidas. Entretanto, como justificado na própria página eletrônica do SINITOX, havia uma reduzida participação dos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (CIATs) nesses levantamentos, o que levou a uma redução dos casos que não reflete a realidade (SINITOX, 2017). Ainda, dados do Sistema de Notificação de Agravos de Notificação (SINAN), registraram 4665 casos de intoxicação por pesticidas em 2013 e 4462 casos em 2014 (SINAN, 2017).

Além da grande importância da intoxicação por pesticidas de forma aguda, a exposição crônica do ser humano a diferentes tipos de pesticidas tem sido relacionada com o aumento do risco de desenvolvimento de diversas doenças crônicas. Os estudos realizados para avaliação da toxicidade e classificação do grau de risco que o pesticida oferece geralmente são realizados em ensaios agudos, não levando em consideração a exposição crônica ambiental ou ocupacional a que as pessoas estão submetidas. Neste sentido, os trabalhadores rurais, de estufas agrícolas, de fábricas de pesticidas, ou envolvidos na mistura e aplicação são os mais expostos a contaminação. Isto se torna ainda pior em países em desenvolvimento, onde existe menor disponibilidade de treinamentos e equipamentos de segurança para trabalhadores deste setor (GANGEMI et al., 2016).

Com relação a exposição ambiental, as principais formas de contaminação da população em geral pelos pesticidas são através da água e alimentos contaminados, ou pelo contato direto com o agente tóxico, no caso de indivíduos que residem em áreas próximas às plantações (GANGEMI et al., 2016). Neste sentido, uma pesquisa realizada no Brasil pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) avaliou, no período de 2013 a 2015, 12051 amostras de 25 alimentos de origem vegetal quanto a presença de 232 diferentes tipos de pesticidas. Neste estudo, observou-se que 58% das amostras apresentaram resíduos dos pesticidas pesquisados, sendo 38,3% dentro do

limite máximo estabelecido pela própria ANVISA. Ainda, 3% das amostras estavam acima dos limites máximos e 18,3% apresentavam resíduos de pesticidas não autorizados para aquela cultura. Um dos dados mais preocupantes do relatório é o fato de muitas amostras apresentarem vários resíduos simultâneos; 1% das amostras pesquisadas apresentava acima de 10 ingredientes ativos diferentes, simultaneamente. Desta forma, pesticidas com mecanismos de toxicidade simultânea poderiam estar levando a uma potencialização da toxicidade exercida sobre o organismo (ANVISA, 2016).

A exposição a longo prazo a pesticidas pode prejudicar a saúde humana, causando danos em diferentes sistemas, incluindo urinário, cardiovascular, reprodutor, respiratório e nervoso. Estes danos estão relacionados ao aparecimento de diversas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, diabetes, doenças respiratórias, nefropatias, déficit de atenção e hiperatividade, autismo, uma grande variedade de tipos de câncer, problemas reprodutivos, deficiências congênitas e problemas de desenvolvimento, além de doenças neurodegenerativas, como esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer e DP (MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; 2017).

Diversos pesticidas têm sido estudados com relação ao seu potencial em aumentar o risco do desenvolvimento da DP. Dentre estes, o paraquat, a rotenona e o maneb são os que foram mais extensamente estudados quanto a sua epidemiologia e mecanismos de toxicidade. Existe grande variabilidade entre os estudos epidemiológicos em relação ao desenho experimental, tais como área geográfica, população controle e tipo de exposição (ocupacional ou não ocupacional). Apesar disso, a grande maioria dos estudos encontrou a razão de chances (RC) acima de 1, indicando uma relação positiva entre a exposição a pesticidas com a incidência da DP (BROWN et al., 2006; VAN DER MARK et al., 2012; MORETTO; COLOSIO, 2013; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2013; BALTAZAR et al., 2014).

O paraquat foi o primeiro pesticida estudado em relação ao risco da DP. O início do interesse por esta ação surgiu ainda em 1984, quando Barbeau sugeriu que devido a semelhança entre a estrutura do paraquat e do MPTP, o paraquat também poderia induzir degeneração de neurônios dopaminérgicos em indivíduos susceptíveis (BARBEAU, 1984; BERRY; LA VECCHIA; NICOTERA, 2010). A partir de então, diversos estudos

epidemiológicos vêm demonstrando a correlação entre a exposição a este pesticida e o aumento da RC para o desenvolvimento da DP (BROWN et al., 2006; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017). Estudos moleculares demonstraram que este pesticida exerce seus efeitos tóxicos principalmente através da produção do ânion superóxido através da inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria. Por ser uma molécula carregada positivamente, necessita de um transportador de aminoácidos para atingir estruturas encefálicas (BROWN et al., 2006; COCHEME; MURPHY, 2008).

A rotenona é um inseticida de ocorrência natural em diversas plantas. É utilizada desde a Segunda Guerra Mundial e seus efeitos tóxicos são devidos, principalmente, à inibição do complexo I da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria. Devido a sua característica altamente lipossolúvel, não requer transportadores para atravessar a BHE e atingir o citoplasma neuronal. Quando administrada sistemicamente em roedores provoca degeneração de neurônios dopaminérgicos da via nigroestriatal, além do aparecimento de inclusões citoplasmáticas contendo α -sinucleína, que se assemelham a precursores dos corpos de Lewy, presentes em pacientes com a DP (BROWN et al., 2006; MORETTO; COLOSIO, 2011).

O maneb é um fungicida da classe dos ditiocarbamatos, com capacidade de lesar neurônios dopaminérgicos quando administrado sistemicamente em roedores. Os efeitos tóxicos *in vivo* do maneb foram descritos de maneira pioneira por pesquisadores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em 1989, que observaram que a administração aguda de maneb em roedores promove redução na locomoção e agressividade, e um aumento na sonolência induzida por barbiturato e na catatonia induzida por haloperidol (MORATO; LEMOS; TAKAHASHI, 1989). Sua capacidade neurotóxica é potencializada quando administrado em conjunto com o paraquat. Essa combinação é de grande importância, pois os dois pesticidas são utilizados frequentemente em diversos locais (BROWN et al., 2006; MOSTAFALOU; ABDOLLAHI, 2017). Além do maneb, outros pesticidas ditiocarbamatos, como o ferbam (dimetilditiocarbamato de ferro), metam (N-metilditiocarbamato de sódio) e ziram (dimetilditiocarbamato de zinco), estão sendo investigados quanto ao seu envolvimento no desenvolvimento da DP.

1.1.4.1 Dimetilditiocarbamato (DMDC)

O DMDC é um composto da classe dos ditiocarbamatos, produzidos a partir do ácido carbâmico, sintetizado primeiramente em 1920 para utilização como acelerador do enxofre no processo de vulcanização da borracha. Alguns compostos dessa classe, incluindo o ziram e o dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC), ainda são utilizados com esta função. Posteriormente, observou-se que além de potencializar o efeito do enxofre como fungicida, o ácido carbâmico possuía proeminente atividade antifúngica *per se* (AZEVEDO, 2003; RODRIGUES, 2006; JIN et al., 2014; EPA, 2017b).

O mecanismo da ação fungicida dos ditiocarbamatos envolve sua característica quelante de metais, privando a célula fúngica de alguns metais essenciais, além de ligarem-se diretamente a enzimas sulfidrílicas essenciais nos processos metabólicos dos fungos. São classificados como fungicidas protetores, por criarem uma barreira protetora tóxica para os fungos, na superfície do hospedeiro. Esta propriedade se deve a sua baixa solubilidade, pois, após serem pulverizados formam uma película sobre as folhas e frutos, protegendo-os dos fungos presentes no ambiente (TOMLIN, 2002; AZEVEDO, 2003).

Recentemente, a exposição ao ziram foi relacionada ao aumento no risco do desenvolvimento da DP em um estudo realizado por Wang e colaboradores (2013). O ziram é amplamente utilizado na agricultura, especialmente no controle da sarna da maçã e pera, além do controle de pragas, como monília, alternaria, septoria, ferrugens, podridão preta e antracnose em cultivos de pomáceas, frutas de caroço, nogueiras, videira, olerícolas e plantas ornamentais (EPA, 2000; RODRIGUES, 2006). Segundo dados da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, do Inglês: *Environmental Protection Agency*), levando-se em consideração as informações sobre o uso agrícola do ziram, entre os anos de 1987 e 1997, foram utilizadas 8,6 milhões toneladas do ingrediente ativo ziram por ano naquele país. Este fungicida também é aprovado para alguns usos residenciais, como aplicações foliares em plantas ornamentais, como conservante em tintas látex e repelente para coelhos. Segundo estimativas da EPA, através do contato durante a preparação e carregamento do ziram para uso agrícola, o trabalhador pode absorver uma dose de até 1,3 mg/kg/dia por via

inalatória e 1,1 mg/kg/dia por via dérmica, totalizando uma dose diária de 2,4 mg/kg (EPA, 2017b) (EPA, 2015).

No estudo realizado por Wang e colaboradores (2011), analisou-se o RC do desenvolvimento da DP na população do vale central da Califórnia (EUA), avaliando-se 362 pacientes parkinsonianos e 341 indivíduos controles. Esses indivíduos foram estudados quanto a sua exposição a 3 diferentes pesticidas (ziram, paraquat e maneb), sendo diferenciada entre exposição residencial ou no local do trabalho, entre os anos de 1974 a 1999. Este estudo demonstrou que tanto a exposição residencial quanto a exposição ocupacional aos 3 pesticidas, separadamente, levou ao aumento na RC da DP, e esse parâmetro foi potencializado quando expostos a 2 ou 3 desses pesticidas, concomitantemente. Esse foi o primeiro estudo epidemiológico relacionando o ziram a etiologia da DP (WANG et al., 2011).

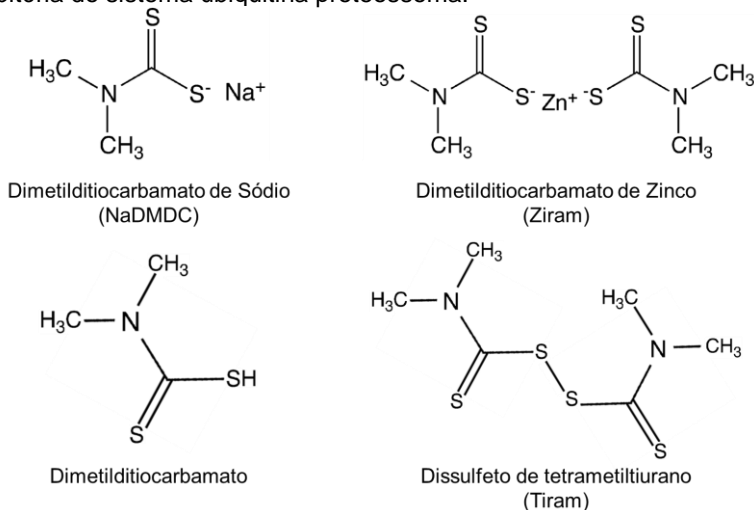
Devido à recente descoberta da relação entre o ziram e a DP, estudos *in vivo* avaliando a neurotoxicidade deste ditiocarbamato em roedores ainda são escassos. O único estudo encontrado na literatura com esta proposta foi realizado por Chou e colaboradores (2008), no qual foi utilizado NaDMDC para experimentos *in vivo* e ziram e outros ditiocarbamatos para experimentos *in vitro*. Esta escolha se deu pelo fato do ziram apresentar baixa solubilidade em água e que, em solução, os dois compostos (ziram e NaDMDC) liberam o dimetilditiocarbamato como a molécula ativa. Nos experimentos *in vivo* realizou-se a administração subcutânea de NaDMDC em camundongos C57/BL6 machos, com o uso de bomba de infusão contínua na dose de 50 mg/kg/dia, durante 2 semanas. Como resultado, os animais apresentaram um prejuízo motor, avaliado pelo tempo de latência para completar a rotação no *pole test*, na segunda e décima semanas após o início do tratamento. Este déficit motor foi relacionado com uma redução da densidade de fibras positivas para a enzima tirosina hidroxilase (TH), enzima limitante na síntese de catecolaminas e usada como um marcador para neurônios dopaminérgicos, no estriado ventrolateral dos animais tratados com NaDMDC, 11 semanas após o início do tratamento (CHOU et al., 2008).

Este mesmo estudo utilizou células embrionárias de rim humano (HEK, do Inglês: *Human Embryonic Kidney*) para avaliar a atividade do sistema ubiquitina proteassoma 26S (UPS, do Inglês: *Ubiquitin-Proteasome System*) após a incubação com

diferentes compostos. Demonstrou-se que o ziram, o NaDMDC, o tiram e o próprio dimetilditiocarbamato inibiram este sistema proteolítico de maneira semelhante. Estas moléculas são muito semelhantes (Figura 4), de modo que, em solução, o ziram e o NaDMDC podem gerar moléculas de tiram, e uma molécula de tiram pode gerar duas moléculas de dimetilditiocarbamato (CHOU et al., 2008). Ainda, Chou e colaboradores (2008) demonstraram que o possível mecanismo de inibição do UPS pelo ziram, seria através da inibição da enzima E1 ligase, que participa no processo de poliubiquitinação, o qual precede a degradação pelo proteassoma. Corroborando esta hipótese, demonstrou-se que o ziram leva ao aumento de α -sinucleína em cultura de neurônios dopaminérgicos, porém não induz a formação de agregados.

Dennis e Valentine (2015) utilizaram células HEK293 para avaliar a possível formação de um aduto entre a enzima E1 ligase e a molécula de dimetilditiocarbamato, advinda do NaDMDC ou do ziram, como um mecanismo de inibição desta enzima. Como resultado, observou-se que estes ditiocarbamatos não realizam uma ligação específica com a enzima. No entanto, demonstrou-se que a toxicidade destes compostos está ligada à sua atividade quelante de metais, podendo carregá-los para dentro das células. O ziram parece aumentar as concentrações intracelulares de cobre e zinco, enquanto o NaDMDC, somente as concentrações de cobre. O aumento nas concentrações intracelulares de metais pode desencadear o processo de estresse oxidativo, o qual, por sua vez, parece inibir a atividade da enzima E1 ligase (DENNIS; VALENTINE, 2015). O íon cúprico (Cu^{2+}), na presença de agentes redutores como o ácido ascórbico e a glutathiona reduzida (GSH), pode ser reduzido a íon cuproso (Cu^+). Este íon pode catalisar a formação de radicais hidroxila (OH^\cdot), altamente reativos, através da decomposição do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de metais de transição (VALKO; MORRIS; CRONIN, 2005).

Figura 4 - Estruturas moleculares de ditiocarbamatos com atividade inibitória do sistema ubiquitina proteossoma.



Fonte: Adaptado de Dennis e Valentine (2015).

O ziram induz também alteração na homeostase do Ca²⁺ intracelular. Esta atividade está relacionada com a modulação da atividade do trocador sódio-cálcio tipo 3 (NCX3, do Inglês: *sodium-calcium exchanger 3*). No estudo de Jin e colaboradores (2014), a incubação *in vitro* do ziram com células de fígado de hamster recém-nascido induzidas a expressarem NCX3 levou a inibição da atividade deste trocador, provocando um aumento do Ca²⁺ intracelular, disfunção mitocondrial, depleção de trifosfato de adenosina (ATP, Inglês: *adenosine triphosphate*) e morte celular. Além disso, o NCX3 também se mostrou importante para a toxicidade do ziram em culturas de neurônios dopaminérgicos. Embora o íon Zn²⁺, liberado na solubilização do ziram, possa causar a inibição *per se* do NCX3, a concentração necessária do íon para surgimento deste efeito é cerca de 14 vezes maior em relação ao ziram (BAO et al., 2005; JIN et al., 2014).

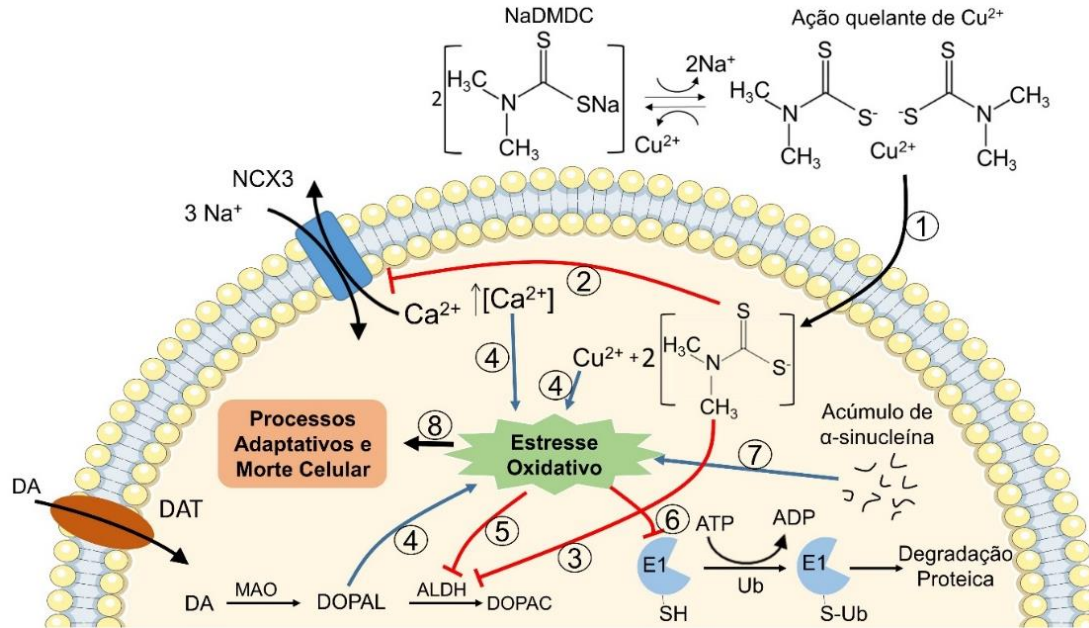
Outro mecanismo pró-oxidativo apresentado pelo ziram é a inibição da enzima aldeído desidrogenase (ALDH). A ALDH é uma enzima de grande importância para a detoxificação de diversos aldeídos endógenos e exógenos através de uma oxidação dependente de NADP⁺. Entre os substratos da ALDH está o

metabólito tóxico, 3,4-diidroxifenil acetaldéido (DOPAL), formado pela enzima monoamina oxidase (MAO) na metabolização da dopamina, posteriormente convertido em ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), com menor toxicidade. A inibição da ALDH provoca um acúmulo de DOPAL, o qual exerce seus efeitos tóxicos através da modificação e agregação de proteínas, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), dano mitocondrial e oxidação a uma quinona altamente reativa. O acúmulo de DOPAL e a consequente morte dos neurônios dopaminérgicos parece estar relacionada com a patogênese da DP (Hipótese Catecol-aldeído) (GOLDSTEIN et al., 2013; CASIDA et al., 2014; DOORN et al., 2014). Além disso, produtos da peroxidação lipídica como o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e o malondialdeído (MDA), gerados pelo estresse oxidativo, inibem significativamente a ALDH (JINSMAA et al., 2009).

No estudo de Fitzmaurice e colaboradores (2014) foi evidenciado o potencial de diferentes pesticidas na inibição da ALDH, incluindo o ziram, que apresentou a inibição mais potente dentre os ditiocarbamatos avaliados. De maneira interessante, este estudo avaliou o RC da DP em indivíduos com uma variação no gene *ALDH2*, a qual leva a uma disfunção na atividade da ALDH neuronal, e que foram expostos a pesticidas inibidores dessa enzima. Os resultados demonstraram que a variação nesse gene levou a exacerbação do RC da DP em indivíduos expostos aos pesticidas (FITZMAURICE et al., 2014).

Lulla e colaboradores (2016) investigaram a toxicidade do ziram em embriões de peixe zebra (*zebrafish*). Este trabalho demonstrou que a incubação com o ziram a partir de 24 horas após a fertilização até o quinto dia provocou uma redução na locomoção destes animais. Esse déficit locomotor foi associado a uma degeneração seletiva dos neurônios dopaminérgicos. A degeneração demonstrou ser dependente da presença e da agregação de γ 1-sinucleína, uma proteína presente no *zebrafish* semelhante a α -sinucleína humana, inclusive com a capacidade de formar agregados espontaneamente. Entretanto, os animais que receberam ziram apresentaram níveis reduzidos de γ 1-sinucleína, contrariamente ao que foi demonstrado por Chou e colaboradores (2008) com relação a α -sinucleína em culturas celulares (LULLA et al., 2016). Um resumo dos dados disponíveis na literatura a respeito dos mecanismos de toxicidade exercidos pelo dimetiltiocarbamato é apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Representação esquemática da toxicidade exercida pelo NaDMDC em neurônios dopaminérgicos.



Legenda: A molécula de dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC) funciona como quelante de íons cobre, auxiliando na entrada destes íons na célula (1). Dentro das células, o NaDMDC é capaz de inibir a atividade do trocador sódio-cálcio (2), causando o aumento da concentração de Ca^{2+} intracelular, e da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) (3), gerando um acúmulo de DOPAL, um metabólito tóxico da dopamina (DA).

Continuação da legenda da Figura 5: O aumento da concentração intracelular de Cu^{2+} , Ca^{2+} e DOPAL potencializa a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e conseqüente estresse oxidativo (4). Reações decorrentes do estresse oxidativo levam a uma redução da atividade da ALDH (5) e da enzima E1 ligase (6), a qual é responsável por iniciar o processo de ubiquitinação para posterior degradação de proteínas pelo sistema ubiquitina-proteossoma. Defeitos no sistema ubiquitina-proteossoma podem levar ao acúmulo da proteína α -sinucleína, característico da doença de Parkinson, o qual também provoca o aumento de EROs (7). Por fim, o estresse oxidativo leva a modificações compensatórias na célula e a ativação de vias apoptóticas (8). DAT: transportador de dopamina. MAO: monoamina oxidase. Ub: ubiquitina. ATP: adenosina trifosfato. ADP: adenosina difosfato.

Fonte: O autor

Atualmente, o ziram não possui autorização de uso como pesticida no Brasil, entretanto outros ditiocarbamatos são aprovados, como metam, metiram (amoniato-etileno-bisditiocarbamato de zinco), mancozebe (etileno-bisditiocarbamato de manganês) e propinebe (propileno-bisditiocarbamato de zinco). Além disso, em novembro de 2016 a ANVISA anunciou que iria iniciar uma reavaliação do pesticida tiram no ano de 2017. A reavaliação já havia sido iniciada em 2008, na qual o parecer emitido pela Fiocruz levou a manutenção dos produtos à base de tiram no mercado. No entanto, resultados divergentes entre Canadá e a União Europeia a respeito da toxicidade deste pesticida levaram a Anvisa a abrir uma nova consulta pública para reavaliação do tiram (ANVISA, 2017).

No Brasil, utiliza-se o ziram na vulcanização da borracha e como conservante em tintas látex. O NaDMDC é encontrado como agente antimicrobiano em embalagens plásticas que ficam em contato direto com alimentos (TOMLIN, 2002; AZEVEDO, 2003). O NaDMDC também é utilizado como biocida nos processos de moagem de açúcar e produção de álcool, com a indicação de proteger a moenda de possíveis contaminações fúngicas e como conservante na indústria do couro (POLYORGANIC, 2017).

Atualmente, no Brasil, o NaDMDC também é utilizado no tratamento de efluentes de indústrias, devido a sua capacidade de sequestrar metais. Este uso já provocou uma tragédia ambiental nos EUA. Em dezembro de 1999, mais de 117 toneladas de peixes morreram no rio White no Estado de Indiana. A empresa *Guide Corporation* foi condenada a pagar 14,2 milhões de dólares de

indenizações. A causa da mortalidade de peixes foi atribuída a alta concentração de NaDMDC utilizada pela empresa para tratar as águas residuais. Além da própria toxicidade do NaDMDC, em solução ele leva a formação de tiram, o qual já demonstrou ser altamente tóxico para organismos aquáticos (EPA, 2000).

2. CAPÍTULO 2: EFEITOS COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICOS DA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NADMDC EM CAMUNDONGOS

2.1 INTRODUÇÃO

2.1.1 Vetorização olfatória na doença de Parkinson

Diariamente, o ser humano está exposto a milhares de xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) os quais estão presentes no ar, na água, em alimentos, bebidas, roupas, móveis, tintas, plásticos, utensílios de cozinha, perfumes, cosméticos, pesticidas, herbicidas, além de emissões veiculares e industriais. Esses xenobióticos podem entrar em nosso organismo através de diversas vias como a pele, os pulmões, a boca, o trato gastrointestinal ou a mucosa nasal. Estes compostos apresentam concentrações reduzidas na circulação periférica pela ação metabólica do fígado (KAMEL et al., 2007; DOTY, 2012; FREIRE ; KOIFMAN, 2012). A entrada de toxinas no SNC é atenuada pela presença da BHE. Entretanto, a BHE pode ter a sua função comprometida pelo avanço da idade e pelas alterações neuropatológicas de algumas doenças, incluindo a DP (KORTEKAAS et al., 2005; BARTELS et al., 2009).

Braak e colaboradores (2003) demonstraram que o bulbo olfatório (BO) é uma das primeiras estruturas afetadas na DP, o que pode dar origem a hiposmia apresentada precocemente pelos pacientes (BRAAK et al., 2003). Além disso, demonstrou-se que a administração intranasal (i.n.) de vírus ou cádmio, bem como a inalação de alumínio ou manganês resulta na deposição destes agentes no SNC (RAVENHOLT; FOEGE, 1982; HIRSCH et al., 1991; HENRIKSSON; TALLKVIST; TJALVE, 1999; TALLKVIST et al., 2002). De encontro com esses achados, a **“hipótese da vetorização olfatória”** sugere que xenobióticos possam utilizar a via olfatória como “porta de entrada” para o SNC, onde exercem seus efeitos tóxicos, provocando o aparecimento de doenças psiquiátricas e neurodegenerativas, como a DP (DOTY, 2008).

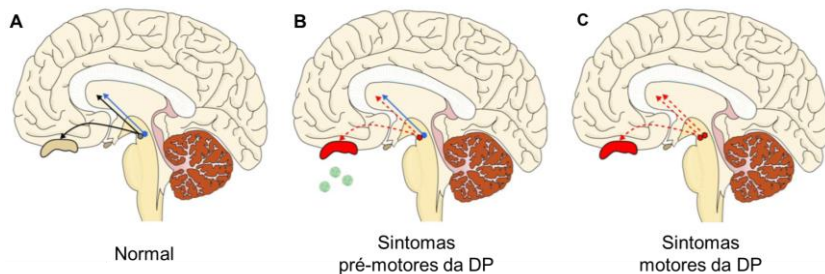
Neste sentido, estudos demonstram que disfunções olfatórias estão presentes em diferentes doenças neurodegenerativas, como doença de Alzheimer, doença de

Huntington e DP. Aproximadamente 90% dos pacientes com DP esporádica apresentam alguma disfunção olfatória, dentre as quais a anosmia funcional e a hiposmia severa são as mais comuns (HAEHNER et al., 2009; DOTY, 2012). Estes déficits fazem parte dos sintomas pré-motores da DP, pois o seu surgimento geralmente ocorre alguns anos antes do aparecimento dos sintomas motores da doença, fato este que pode facilitar o diagnóstico diferencial da DP em relação a outras doenças que promovem alterações motoras (para revisão ver: SAMPAIO et al., 2017).

Classicamente, sabe-se que o BO está conectado a diferentes regiões cerebrais, como o trato olfatório, núcleo olfatório anterior, córtex piriforme, amígdala e hipotálamo. Hoglinger e colaboradores (2015) demonstraram recentemente a existência de uma subpopulação de neurônios que emitem projeções dopaminérgicas da substância negra para o BO (via *nigro*-olfatória), as quais demonstraram ser importantes para a percepção olfatória. A administração de MPP⁺ ou 6-OHDA (6-hidroxidopamina) diretamente no BO provocou a redução de neurônios dopaminérgicos no estriado. Desta forma, foi hipotetizado que estas projeções podem ser responsáveis pelo transporte retrógrado de xenobióticos das vias olfatórias até os gânglios da base. Este transporte pode ocasionar primariamente a morte dos neurônios da via *nigro*-olfatória, levando a hiposmia, e, posteriormente, o processo de degeneração pode se propagar, levando a morte dos neurônios da via *nigro*-estriatal e ao aparecimento dos sintomas motores da DP (Figura 6) (HOGLINGER et al., 2015).

Resultados do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que a administração i.n. de MPTP induz alterações comportamentais (prejuízos olfatórios, emocionais, cognitivos e motores) e neuroquímicas (lesão de neurônios dopaminérgicos e redução de dopamina em diferentes áreas cerebrais) em ratos e camundongos muito semelhantes àquelas observadas na DP (PREDIGER et al., 2006; PREDIGER et al., 2011; PREDIGER et al., 2012a). Além disso, diversos outros estudos têm investigado os efeitos da administração i.n. de diferentes substâncias, como metais, vírus, neurotoxinas e pesticidas em roedores. Um breve sumário de resultados de estudos relevantes neste campo é apresentado no Quadro 1.

Figura 6 - Esquema do mecanismo hipotético da degeneração dopaminérgica na doença de Parkinson a partir da inalação de toxinas ambientais



Legenda: (A) Sob condições fisiológicas, uma subpopulação de neurônios dopaminérgicos da substância negra (setas pretas) envia projeções para o estriado e para o bulbo olfatório, enquanto outra subpopulação envia projeções somente para o estriado. (B) Toxinas ambientais (em verde) podem penetrar no sistema nervoso central pela via olfatória, utilizando as projeções *nigro-olfatórias* e causando a morte desses neurônios (setas vermelhas pontilhadas). A perda desta via pode estar relacionada ao aparecimento da hiposmia que precede os sintomas motores na doença de Parkinson (DP). (C) A neurodegeneração se propaga, levando à degeneração da via *nigro-estriatal* e ao aparecimento dos sintomas motores.

Fonte: Hoglinger e colaboradores (2015).

Quadro 1 - Sumário de estudos comportamentais e neuroquímicos após administração intranasal de contaminantes ambientais em diferentes espécies animais.

Contami- nantes	Espécie animal	Exposição ao contaminante	Principais resultados	Referência
Cádmio	Ratos machos Sprague-Dawley	Administração de μg de $^{109}\text{Cd}^{2+}$ em 10 μL de salina, diretamente na cavidade nasal direita.	O $^{109}\text{Cd}^{2+}$ foi transportado para dentro do BO e foi detectado no epitélio olfatório direito, na mucosa olfatória direita e no BO direito. Uma quantidade menor foi encontrada no BO esquerdo.	TALLKVIST et al. (2002)
Alumínio	Coelhos machos Adultos Nova Zelândia	Durante 12 semanas, os animais foram expostos a 250 mg/kg por semana silicato de alumínio sob a forma de caulim em pó, polvilhado em sua serragem.	Os níveis de alumínio aumentaram na mucosa olfatória, em glomérulos do BO, e em alguns núcleos da região da medula. Não houve aumento nos níveis de alumínio no sangue ou no cerebelo, indicando que as alterações foram seletivas para a via olfatória.	HAYEK (1991)
Manganês	Ratos machos Sprague-Dawley	10 μL de uma solução de $^{54}\text{MnCl}_2$ foi aplicada na narina direita dos animais em diferentes doses (0.1-1120 μg de $^{54}\text{Mn}^{2+}$).	O ^{54}Mn atingiu o BO e córtex olfatório, se espalhando para o resto do cérebro. Os níveis de ^{54}Mn foram sempre maiores no BO e córtex direito em comparação ao esquerdo.	HENRIKSSON; TALLKVIST; TJALVE (1999)

Quadro 1 – Continuação.

Contami- nantes	Espécie animal	Exposição ao contaminante	Principais resultados	Referência
Vírus Influenza H5N1	Camun- dongos machos C57BL/6J	Os camundongos foram inoculados via i.n. 30 µL de fluido alantoico diluído em PBS.	Os vírus atingiram o SNC. A ativação da microglia e a fosforilação e agregação de α -sinucleína persistiram após a resolução da virose. Houve uma perda significativa dos neurônios da substância negra, após 60 dias.	JANG et al. (2009)
6-OHDA	Camun- dongos fêmeas CD-1	Infusão i.n. única de 50 µL de uma solução de 6-OHDA 48% em salina, contendo 0,02% de ácido ascórbico.	Redução no conteúdo de noradrenalina no BO. Sem alterações nos níveis de dopamina e seus metabólitos no BO. Sem alteração nos níveis de catecolaminas em outras estruturas cerebrais.	KAWANO;MAR GOLIS (1982)
MPTP	Camun- dongos machos C57BL/6	Infusão i.n. durante 30 dias consecutivos de 10 µl de uma solução de MPTP (75 e 150 mg/ml para as doses de 30 e 60 mg/kg, respectivamente).	Redução no comportamento de ambulação no teste do campo aberto. Redução da imunoreatividade da TH e DAT no estriado e SNpc. Esgotamento progressivo e grave dos níveis de DA estriatal. Astrogliose e microgliose no SN e estriado. A agregação de α -sinucleína não foi observada.	ROJO et al. (2006)
MPTP	Ratos machos Wistar	Infusão i.n. de MPTP, 0,1 mg/narina.	Déficits olfatório, cognitivo e motor. Redução dos níveis de TH no BO e estriado. Redução da DA no BO, estriado e córtex pré-frontal.	PREDIGER et al. (2006)

Quadro 1 – Continuação.

MPTP	Camundongos machos C57BL/6	Infusão i.n. de MPTP, 1 mg/narina.	Déficits olfatórios e cognitivos. Redução dos níveis de TH na SN, BO e estriado. Redução da DA na SN, estriado e BO. Aumento do número de células positivas para caspase-3 clivada na SN.	PREDIGER et al. (2010)
MPTP	Camundongos machos C57BL/6	Infusão i.n. de MPTP, 1 mg/narina, por quatro dias consecutivos.	Redução nos níveis de TH e aumento da astrogliose, na SN e no estriado, 7 e 28 dias após a última administração de MPTP.	TRISTAO et al. (2014)
Rotenona	Camundongos machos C57BL/6	Infusão i.n. durante 30 dias consecutivos de 10 µl de uma solução de rotenona (6,26 mg/ml para uma dose de 2,5 mg/kg).	Nenhuma alteração locomotora observada. Sem alteração nos níveis de DA e TH.	ROJO et al. (2007)
Rotenona	Camundongos fêmeas BALB/c	Infusão i.n. de 0,35 mg/kg, somente na narina direita.	Déficit olfatório no teste de esquiva do ácido butírico. Redução de células positivas para TH no BO. Estresse mitocondrial no BO.	SASAJIMA et al. (2015)

Quadro 1 – Continuação.

Paraquat	Camundongos machos C57BL/6	Infusão i.n. durante 30 dias consecutivos de 10 µl de uma solução de MPTP (25, 50 e 75 mg/ml para as doses de 10, 20 e 30 mg/kg, respectivamente).	Déficit locomotor nas doses de 20 e 30 mg/kg. Sem alteração nos níveis de DA e TH.	ROJO et al. (2007)
----------	----------------------------	--	--	--------------------

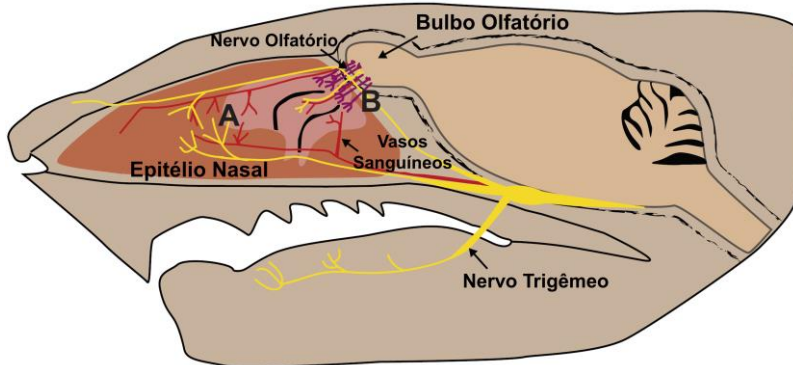
Legenda: Sumário de estudos comportamentais e neuroquímicos após administração intranasal (i.n.) de contaminantes ambientais em diferentes espécies animais. ¹⁰⁹Cd²⁺: cádmio, BO: bulbo olfatório; ⁵⁴MnCl₂: cloreto de manganês; ⁵⁴Mn: manganês; SNC: sistema nervoso central; PBS: tampão fosfato salina; 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; MPTP: 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina; TH: tirosina hidroxilase; DAT: transportador de dopamina; DA: dopamina; SNpc: parte compacta da substância negra; SN: substância negra.

Fonte: Adaptado de Prediger et al. (2012).

2.1.2 Possíveis vias de transporte de substâncias da cavidade nasal para o sistema nervoso central

A anatomia e a histologia da cavidade nasal facilitam a absorção de xenobióticos. Esta cavidade é dividida pelo septo nasal, do qual são projetadas as conchas inferior, média e superior, o que aumenta a superfície passível de absorção para cerca de 160 cm² em humanos. O formato das conchas facilita o condicionamento do ar inspirado, uma das principais funções desta cavidade. A cavidade nasal é recoberta por quatro diferentes tipos de epitélio: escamoso, respiratório, transicional e olfatório, gerando diferentes regiões. A região olfatória e a região respiratória são as mais relacionadas com a absorção de substâncias devido às suas características anatômicas e histológicas (DHURIA; HANSON; FREY, 2010). Uma ilustração simplificada da cavidade nasal de um roedor mostrando a localização das regiões olfatória e respiratória é apresentada na Figura 7.

Figura 7 - Vias de distribuição de toxinas na cavidade nasal e sistema nervoso central de roedores.



Legenda: (A) Região respiratória. (B) Região olfatória.

Fonte: Adaptado de Dhuria e colaboradores (2010).

A região olfatória está localizada na parte superior da cavidade nasal e é constituída por epitélio pseudoestratificado e

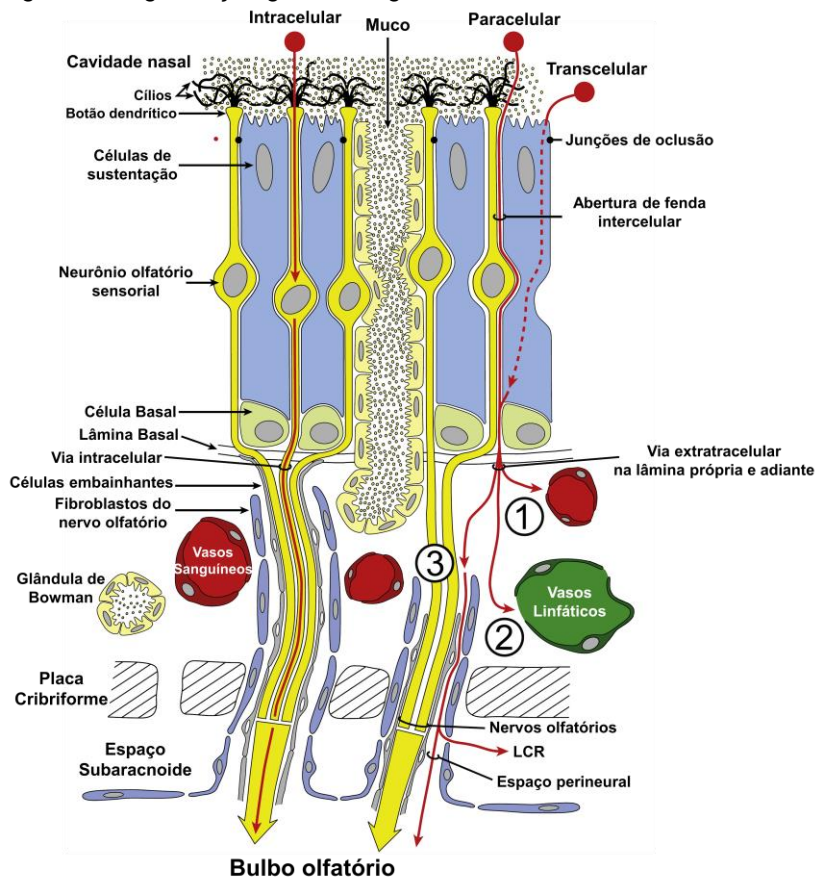
diferentes tipos celulares. A lâmina própria, abaixo da região olfatória, possui vasos sanguíneos, tecido conectivos e linfáticos, e glândulas de Bowman, as quais secretam muco capaz de solubilizar moléculas odorantes presentes no ambiente, além de enzimas e anticorpos. Nesta região estão localizados os neurônios olfatórios sensoriais, os únicos neurônios de primeira ordem com os corpos celulares localizados em um epitélio fora do SNC. As extremidades dos processos dendríticos destes neurônios são ampliadas e possuem cílios não móveis que se estendem até a camada mais externa de muco, para aumentar o contato com o meio externo. Nestas terminações, estão presentes os receptores olfatórios, os quais possuem sete domínios transmembrana e são acoplados a proteína G, sendo ativados por diferentes moléculas presentes no ambiente para transmissão da informação sensorial olfatória. As fibras dos neurônios olfatórios sensoriais atravessam a placa cribiforme do osso etmoide e o espaço subaracnoide, e chegam até as células mitrais no BO (JIANG et al., 2011; LOCHHEAD; THORNE, 2012; SAMPAIO et al., 2017).

A região respiratória ocupa aproximadamente 80-90% da superfície da cavidade nasal em humanos. Nesta região, o ar inspirado é aquecido e humedecido, e ocorre a retenção de partículas, micro-organismos e alérgenos. O epitélio desta região é constituído por células calciformes, ciliadas, intermediárias e basais. Ainda, possui glândulas serosas, seromucosas e intraepiteliais. As células ciliadas, através do movimento dos cílios, geram um fluxo de muco para a nasofaringe, de onde as substâncias são deglutidas ou expectoradas (DHURIA; HANSON; FREY, 2010).

Os mecanismos exatos pelos quais os xenobióticos atingem o SNC a partir da cavidade nasal ainda não são completamente compreendidos. Entretanto, o nervo olfatório (primeiro par de nervos cranianos) e o nervo trigêmeo (quinto par de nervos cranianos), que ligam a cavidade nasal ao cérebro e à medula espinal, parecem ter grande importância (Figuras 8 e 9, respectivamente). Além disso, a circulação sanguínea, o líquido cefalorraquidiano e o sistema linfático atuam em conjunto com a via nervosa no transporte destas substâncias para o SNC. As propriedades físico-químicas da molécula em questão podem influenciar a via que será predominantemente utilizada (LOCHHEAD; THORNE, 2012; MUSTAFA et al., 2016).

Devido ao contato constante com toxinas presentes no ambiente, capazes de levar ao dano dos neurônios olfatórios sensoriais, estes neurônios são regenerados a cada 3 a 4 semanas a partir de células basais que estão presentes no epitélio olfatório. Esta constante renovação pode deixar a barreira nasal “vazada”. Neste sentido, as células embainhantes, semelhantes às células de Schwann, criam uma espécie de canal em torno das fibras dos neurônios olfatórios sensoriais, que permanecem abertos independentemente da degeneração ou regeneração destes neurônios. Assim, através da via do nervo olfatório, os xenobióticos podem se propagar extracelularmente para atingir o SNC. Ainda, a renovação constante das células do epitélio olfatório pode levar a uma redução das junções oclusivas, presentes entre as células epiteliais e que poderiam dificultar a passagem de substâncias por esse epitélio (DHURIA; HANSON; FREY, 2010; LOCHHEAD; THORNE, 2012).

Figura 8 - Organização geral da região olfatória da cavidade nasal.



Legenda: A mucosa olfatória inclui o epitélio olfatório e sua lâmina própria subjacente. Os processos axonais dos neurônios sensoriais convergem em feixes, cercados por células embainhantes e fibroblastos antes de se projetar ao bulbo olfatório (BO). As potenciais vias para transporte de toxinas através do epitélio olfatório estão em vermelho. Algumas substâncias podem ser transportadas pela via intracelular, do epitélio olfatório até o BO, dentro dos neurônios sensoriais olfatórios devido a endocitose absorptiva, mediada por receptor, ou não específica. Outras substâncias podem cruzar a barreira do epitélio olfatório através do transporte paracelular ou transcelular, até atingir a lâmina própria, onde diferentes vias extracelulares de distribuição são possíveis, como indicado: (1) absorção para vasos sanguíneos olfatórios e entrada na circulação sistêmica;

Continuação da legenda da Figura 8: (2) absorção para os vasos linfáticos olfatórios, sendo drenadas para os linfonodos cervicais; e (3) difusão extracelular em compartimentos associados com os feixes do nervo olfatório até a entrada no compartimento craniano. O transporte dentro do espaço perineural delimitado pelos fibroblastos do nervo olfatório também é demonstrado. LCR, líquido cefalorraquidiano.

Fonte: Lochhead e Thorne (2012)

Outra forma de propagação pela região olfatória é a via intracelular, sendo necessária a absorção das moléculas pelos neurônios olfatórios sensoriais, a qual pode ocorrer por difusão passiva, endocitose mediada por receptor ou endocitose por adsorção. Estudos têm demonstrado que os neurônios olfatórios sensoriais são capazes de realizar a endocitose de vírus e de moléculas grandes como peroxidase de rábano silvestre e albumina. O transporte extracelular parece ser mais rápido, levando poucos minutos para que a substância atinja o SNC, em comparação ao transporte intracelular, pelo qual o a molécula pode levar horas ou dias para ser encontrada no BO ou outras estruturas encefálicas (THORNE et al., 2008; DHURIA; HANSON; FREY, 2010).

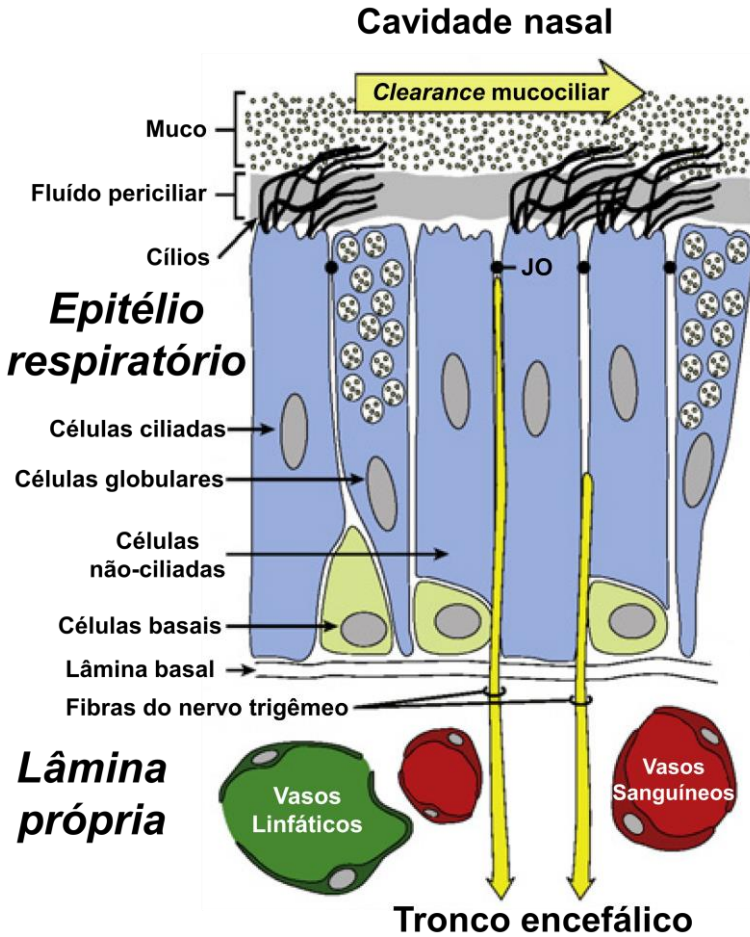
O nervo trigêmeo também apresenta grande importância para o transporte de substância para o SNC (Figura 9). Este nervo é o maior entre os nervos cranianos, e é considerado um nervo misto, pois possui fibras motoras, que inervam músculos relacionados com a mastigação, e fibras sensoriais, que transmitem informações sensoriais da face, do escalpo, da boca e das cavidades nasais. O trigêmeo é dividido em 3 ramos: oftálmico, maxilar e mandibular, sendo que os dois primeiros inervam a região respiratória da cavidade nasal. Ainda, o nervo trigêmeo envia uma projeção para o BO, que parte da cavidade nasal, atravessando a placa cribriforme. Os três ramos do trigêmeo então se unem chegando até o gânglio trigeminal, de onde partem para os núcleos trigeminais, presentes no tronco encefálico. Assim, este nervo possui duas portas de entrada para o SNC, facilitando a chance de entrada de xenobióticos (LOCHHEAD; THORNE, 2012).

Estudos em roedores demonstraram que a administração i.n. de peptídeos radiomarcados leva a concentrações elevadas destas moléculas no trigêmeo, e que a administração de algumas drogas por esta mesma via leva a distribuição em áreas caudais

do encéfalo (THORNE et al., 2004; THORNE et al., 2008). Entretanto, ainda são poucos os estudos que avaliam a participação do trigêmeo na propagação de substâncias a partir da cavidade nasal.

Thorne e colaboradores (2004), utilizando o fator de crescimento semelhante a insulina-tipo I (IGF-I, do Inglês: *Insulin-like Growth Factor-I*) radiomarcado com I^{125} ($[I^{125}]$ -IGF-I), demonstraram que a administração desta proteína por via i.n. em ratos Sprague-Dawley leva a um rápido aparecimento da mesma no SNC, e que o transporte pode ser feito através dos nervos olfatório e trigêmeo. Aproximadamente 30 minutos após a administração i.n. do $[I^{125}]$ -IGF-I, esta proteína já pode ser detectada no BO e no tronco encefálico. Ainda, Thorne e colaboradores (2008) demonstraram que a administração i.n. de interferon- β 1b (IFN- β 1b) radiomarcado com I^{125} ($[I^{125}]$ -IFN- β 1b), em macacos *Cynomolgus*, levou a uma detecção desta proteína em diversas estruturas encefálicas. A concentração detectada de ($[I^{125}]$ -IFN- β 1b) foi significativamente maior no BO e no nervo trigêmeo em comparação a órgãos periféricos e outras estruturas do SNC. De grande importância, este estudo demonstrou que, com exceção do BO, as maiores concentrações de ($[I^{125}]$ -IFN- β 1b) foram encontradas em estruturas dos gânglios da base, como caudado, putâmen, globo pálido, núcleo accumbens e substância negra. Dentre estes, as estruturas estriatais (caudado, putâmen e globo pálido) foram as que apresentaram maiores níveis da proteína marcada (THORNE et al., 2004).

Figura 9 - Organização geral e inervação trigeminal da região respiratória da cavidade nasal.



Legenda: A mucosa respiratória inclui o epitélio respiratório e sua lâmina própria subjacente. As fibras do nervo trigêmeo, importante para a transmissão da informação quimiosensorial, nociceptiva, tátil e térmica, são encontradas no epitélio nasal, onde suas terminações livres se estendem até próximo da superfície epitelial, logo abaixo das junções ocludentes (JO).

Fonte: Lochhead e Thorne (2012).

A partir da cavidade nasal os xenobióticos também podem ganhar acesso a lâmina própria, através do transporte transcelular,

sendo endocitados pelas células epiteliares e liberados nesta camada. A chegada na lâmina própria é de grande importância devido à presença de vasos sanguíneos e linfáticos, os quais podem realizar o transporte dessas substâncias (MUSTAFA et al., 2016).

A alta irrigação sanguínea da cavidade nasal facilita a absorção de xenobióticos para a circulação. Esta cavidade é irrigada pelos ramos das artérias maxilar, oftálmica e facial que surgem da artéria carótida. Ainda, a irrigação não é feita de forma homogênea, pois a região olfatória recebe uma densidade de vasos sanguíneos maior, em relação a região olfatória. Após serem absorvidos, os xenobióticos podem seguir para a circulação sistêmica, ou sofrerem a chamada transferência contracorrente, chegando à artéria carótida e sendo distribuídos para o encéfalo e medula espinal. Na circulação sistêmica, sofrem processos de eliminação hepática e renal e ligação a proteínas plasmáticas, o que leva a uma redução drástica em sua concentração. Além disso, as substâncias presentes na circulação têm sua entrada no SNC limitada pela presença da barreira hemato-encefálica (DHURIA; HANSON ; FREY, 2010; MUSTAFA et al., 2016)

Outra possibilidade para as substâncias atingirem o SNC a partir da circulação sanguínea é a passagem pelos espaços perivasculares. Estes espaços são formados entre a camada mais externa dos vasos sanguíneos e a membrana basal do tecido circundante e podem funcionar como um sistema linfático para o SNC, eliminando até mesmo moléculas grandes como a proteína β -amiloide, provavelmente através de mecanismos de transporte de massa. Estudos têm demonstrado que substâncias administradas pela via i.n. podem atingir estes espaços, o que facilitaria a chegada a estruturas encefálicas (LOCHHEAD ; THORNE, 2012; SAMPAIO et al., 2017).

Os vasos linfáticos presentes na lâmina própria também podem ser uma porta de entrada para o sistema nervoso central. A absorção de substâncias administradas na cavidade nasal já foi demonstrada através de experimentos utilizando corantes que foram administrados nesta cavidade e detectados nos linfonodos cervicais. Além disso, outros experimentos demonstraram que corantes administrados no LCR podem atingir o espaço perineural do nervo olfatório e de lá serem drenados para os linfonodos cervicais. Ainda, alguns estudos anatômicos já demonstraram a presença de comunicação entre os vasos linfáticos olfatórios e o

LCR, o que indica que o sistema linfático também poderia ser uma porta de entrada de xenobióticos para o SNC (DHURIA; HANSON; FREY, 2010; LOCHHEAD; THORNE, 2012).

2.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A DP é caracterizada como uma doença multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais em sua etiologia. Diversos estudos têm demonstrado a relação entre a exposição a xenobióticos, como pesticidas, e o risco aumentado do desenvolvimento da DP. Neste sentido, o fato da via olfatória representar um fácil acesso entre o meio externo e o SNC fortalece a hipótese da vetorização olfatória nas doenças neurodegenerativas. Somando-se a isto, recentemente, a exposição ao pesticida ziram foi relacionada ao aumento no risco do desenvolvimento da DP. Este pesticida, assim como outros sais de dimetilditiocarbamato são amplamente utilizados na agricultura e indústria. Desta maneira, hipotetizamos que a administração i.n. de NaDMDC poderia provocar alterações comportamentais e bioquímicas relacionadas a DP em camundongos.

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste capítulo foi avaliar os efeitos da administração i.n. do NaDMDC sobre a função motora de camundongos, bem como investigar o envolvimento do sistema dopaminérgico e do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade desta molécula.

2.3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito agudo da administração i.n. de NaDMDC sobre a temperatura corporal de camundongos;
- Investigar o efeito de diferentes protocolos de administração i.n. de NaDMDC (1, 2 ou 4 administrações) sobre a função motora de camundongos, avaliada nos testes do campo aberto, e rotarod, e no estado neurológico geral dos animais através do uso do escore neurológico de severidade (ENS);
- Investigar o efeito da administração sistêmica (intraperitoneal, i.p.) de NaDMDC (4 administrações) sobre a função motora de camundongos, avaliada nos testes do campo aberto, e rotarod, e no estado neurológico geral dos animais através do uso do escore neurológico de severidade (ENS);

- Investigar as possíveis alterações no imunoconteúdo de TH, enzima limitante na síntese de catecolaminas (usada como um marcador de neurônios dopaminérgicos), no BO e estriado de camundongos após a administração i.n. de NaDMDC;

- Investigar as possíveis alterações nos níveis do fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do Inglês: *Tumor Necrosis Fator- α*), marcador inflamatório, no BO e estriado de camundongos após a administração i.n. de NaDMDC;

- Avaliar o efeito agudo do tratamento com L-DOPA e apomorfina sobre as possíveis alterações na função motora e estado neurológico geral induzidas pelo NaDMDC em camundongos;

- Avaliar os níveis de dano celular e EROs no BO e estriado de camundongos após a administração i.n. de NaDMDC.

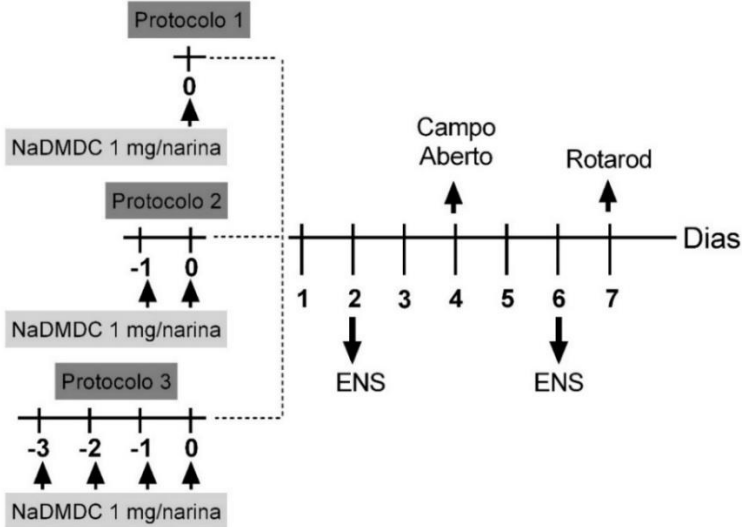
2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Protocolos experimentais

Bloco experimental 1 – Efeitos comportamentais da administração i.n. de NaDMDC. Com o objetivo de avaliar se a administração i.n. de NaDMDC poderia levar a alterações motoras em camundongos, semelhantes às observadas na DP em humanos, foram realizados 3 diferentes protocolos de administração: 1, 2 ou 4 administrações em dias consecutivos de uma dose de 1 mg/narina, sendo nomeados de protocolos 1, 2 e 3, respectivamente (Figura 10). Após a última, ou, no caso do protocolo 1, da única administração, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais: ENS, nos dias 2 e 6; campo aberto, no dia 4; e rotarod, no dia 7. O último dia de administração foi considerado como dia zero. Além disso, a temperatura corporal dos animais foi mensurada 1 hora antes e 1, 2, 4 e 6 horas após a primeira administração de NaDMDC. A escolha da dose foi baseada em uma aproximação a dosagem usada sistemicamente por Chou e colaboradores (2008), e em resultados prévios do nosso grupo com a utilização do modelo do MPTP intranasal em camundongos (PREDIGER et al., 2010).

Após a realização do bloco experimental 1, o protocolo 3 consistindo em 4 administrações i.n. de NaDMDC foi selecionado para a realização dos experimentos subsequentes.

Figura 10 – Desenho e protocolos experimentais usados para a avaliação das alterações comportamentais induzidas pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.



Legenda: Linha do tempo ilustrando os três protocolos de tratamento com o NaDMDC utilizados e a distribuição temporal das avaliações comportamentais. Os animais foram submetidos a três diferentes protocolos de administração intranasal de dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC). O protocolo 1 consistiu em uma única administração de NaDMDC (1 mg/narina). O protocolo 2 consistiu em duas administrações de NaDMDC (1mg/narina) em dias consecutivos. O protocolo 3 consistiu em 4 administrações de NaDMDC (1 mg/narina) em dias consecutivos. Posteriormente os animais foram avaliados em diferentes testes comportamentais como apresentado na figura. ENS: escore neurológico de severidade.

Bloco experimental 2 – Avaliação das alterações motoras e do estado neurológico induzidas pela administração i.p. de NaDMDC em camundongos. Para investigar se as alterações comportamentais observadas após a i.n. do NaDMDC em camundongos poderiam ser decorrentes de sua distribuição sistêmica a partir da cavidade nasal, realizou-se a administração i.p. de NaDMDC (50 mg/kg) em 4 dias consecutivos, semelhante ao realizado no protocolo 3 da administração i.n. de NaDMDC. A bateria de testes comportamentais também foi a mesma utilizada no bloco experimental 1. A dose escolhida levou

em consideração uma aproximação com a dose máxima que os animais poderiam receber com a administração i.n., observando-se que a massa corporal dos animais variou entre 45-60 g.

Bloco experimental 3 - Efeito da administração i.n. de NaDMDC sobre o imunocorrelato de TH e níveis de TNF- α no BO e estriado de camundongos. Para avaliação da possível relação entre as alterações comportamentais induzidas pela administração i.n. de NaDMDC com o imunocorrelato da enzima TH, e com os níveis de TNF- α , realizou-se a dosagem destes marcadores no sétimo dia após a última administração do NaDMDC, no final das avaliações comportamentais, no BO e estriado dos animais. A enzima TH é considerada um marcador de neurônios dopaminérgicos e o seu imunocorrelato foi avaliado pela técnica de *Western blotting*. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória e foi quantificada pela técnica de ensaio de imunoadsorção ligado a enzima (ELISA, do Inglês: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Bloco experimental 4 – Investigação dos efeitos de fármacos com ação dopaminérgica sobre as alterações comportamentais induzidas pela administração i.n. de NaDMDC. Para avaliar se as alterações comportamentais induzidas pela administração i.n. de NaDMDC (protocolo 3) poderiam ser revertidas ou atenuadas pela administração de fármacos que estimulam a neurotransmissão dopaminérgica, realizou-se a administração de L-DOPA/benserazida ou apomorfina. A solução de L-DOPA/benserazida (100 mg/kg/25 mg/kg) (ZAITONE; HAMMAD ; FARAG, 2013) ou veículo (controle) (10 mL/kg) foi administrada por via oral (v.o.), 1 h antes de cada avaliação comportamental.

Para maior facilidade na descrição dos resultados e discussão, os grupos foram nomeados e divididos da seguinte maneira:

- **Grupo Controle:** Controle i.n. + Controle v.o.;
- **Grupo NaDMDC:** NaDMDC i.n. + Controle v.o.;
- **Grupo L-DOPA:** Controle i.n. + L-DOPA/benserazida v.o.;
- **Grupo NaDMDC + L-DOPA:** NaDMDC i.n. + L-DOPA/benserazida v.o.

A L-DOPA é um fármaco precursor da dopamina em neurônios dopaminérgicos e a benserazida é um inibidor periférico da enzima dopa-descarboxilase, responsável pela metabolização da L-DOPA em tecidos periféricos (fígado e intestino), limitando a sua chegada ao SNC.

A apomorfina, um agonista não seletivo dos receptores dopaminérgicos, foi administrada por via subcutânea (s.c.), na dose de 0,5 mg/kg (YUREK et al., 1989; MOREIRA et al., 2010), 30 minutos antes da realização dos testes comportamentais. Os grupos foram nomeados e divididos da seguinte maneira:

- **Grupo Controle:** Controle i.n. + Controle s.c.;
- **Grupo NaDMDC:** NaDMDC i.n. + Controle s.c.;
- **Grupo Apomorfina:** Controle i.n. + Apomorfina s.c.;
- **Grupo NaDMDC + Apomorfina:** NaDMDC i.n. + Apomorfina s.c.

As drogas foram diluídas em solução salina (NaCl 0,9%) e esta solução foi utilizada no tratamento do grupo Controle.

Bloco experimental 5 - Avaliação dos níveis de EROs e do dano a membrana celular 2 h e 24 h após a última administração i.n. de NaDMDC. Com o objetivo investigar se as alterações comportamentais induzidas pela administração i.n. de NaDMDC estão associadas ao aumento inicial do estresse oxidativo e ao dano a membrana celular, no BO e estriado, estas estruturas foram coletadas 2 e 24 horas após a última administração de NaDMDC.

2.4.2 Animais

Para realização deste trabalho foram utilizados camundongos Swiss machos, com 90 dias de idade, pesando entre 45 e 60 g, fornecidos pelo biotério central da UFSC. Os animais foram mantidos em gabinetes climatizados (Insight, Ribeirão Preto, Brasil), em gaiolas plásticas retangulares (49 x 34 x 16 cm), a $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro escuro de 12 horas (acendimento das luzes às 7 horas), com livre acesso a água e ração e limite máximo de 10 animais por gaiola. Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética para o uso de animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo número PP0830/2013.

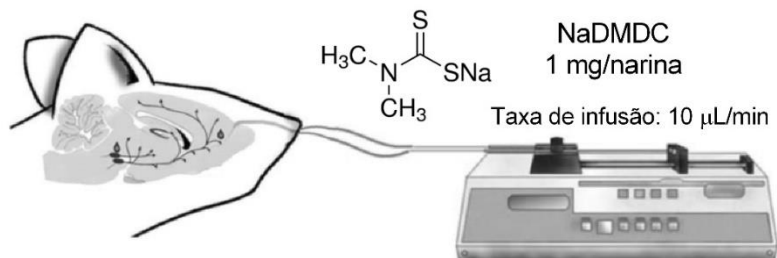
2.4.3 Drogas

O dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC) (D156604, Sigma-Aldrich), foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) a uma concentração de 100 mg/mL. A solução de L-DOPA + benserazida foi preparada a partir de comprimidos do medicamento comercial Prolopa® (Roche) contendo 50 mg de L-DOPA + 12,5 mg de benserazida. Os comprimidos foram macerados e diluídos em solução salina a uma concentração de L-DOPA (10 mg/mL) + benserazida (2,5 mg/mL). A apomorfina (A4393, Sigma-Aldrich) foi diluída em solução salina a uma concentração de 0,05 mg/mL. A solução salina foi utilizada como controle, sendo administrada pela mesma via do fármaco em questão.

2.4.4 Administração intranasal de NaDMDC

Para a administração i.n. de NaDMDC utilizou-se um procedimento semelhante ao descrito por Prediger et al. (2010). Os animais foram levemente anestesiados com isoflurano 0.96% (0.75 CAM; Abbot Laboratórios do Brasil Ltda, RJ, Brasil), e um tubo de polietileno (PE 10) foi introduzido aproximadamente 7 mm na narina do animal. Um volume de 10 µL de NaDMDC, 100 mg/mL (correspondendo a uma dose de 1 mg/narina) ou controle (NaCl 0,9%) foi administrado na narina do animal a uma taxa de infusão de 10 µL/min, com o auxílio de uma micro-seringa de 10 µl (Hamilton, USA), acoplada a uma bomba de infusão (Insight, Brasil) (Figura 11). Após um intervalo de 5 min, para os animais recuperarem a função respiratória normal, esse procedimento foi repetido para a infusão na narina contralateral.

Figura 11 – Ilustração do procedimento utilizado para a administração intranasal de NaDMDC em camundongos.



Legenda: Representação do tratamento intranasal com NaDMDC (1 mg/narina) através de bomba de infusão e tubo de polietileno. O NaDMDC foi diluído a uma concentração de 0,1 mg/µL e infundido a uma taxa de 10 µL/min.

Fonte: Adaptado de Prediger e colaboradores (2010).

2.4.5 Avaliação da temperatura corporal

A temperatura corporal foi mensurada 1 h antes e 1, 2, 4 e 6 horas após a administração i.n. de NaDMDC. A mensuração foi realizada através de uma sonda para camundongos (4,2 mm de diâmetro) introduzida 1-2 cm no reto dos animais, conectada a um termômetro (modelo Thermistor #8402-00, Cole-Parmer, Vernon Hills IL, EUA), com acurácia de 0,1 °C.

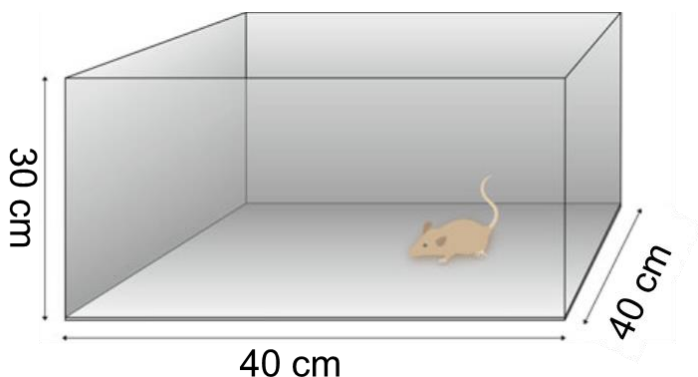
2.4.6 Testes comportamentais

2.4.6.1 Campo aberto

A avaliação da locomoção espontânea dos animais foi realizada utilizando-se o teste do campo aberto, como descrito previamente (PREDIGER et al., 2008). O teste foi realizado 4 dias após a última administração i.n. de NaDMDC. O aparato utilizado é feito em acrílico, com paredes transparentes e chão na cor cinza, medindo 40 cm x 40 cm x 30 cm, como observado na Figura 12. Os animais foram colocados individualmente no centro do campo aberto e exploraram livremente o aparato durante 5 min. Os comportamentos realizados pelos animais durante o período que permaneceram no aparato foram gravados a partir de um sistema de monitoramento por uma câmera localizada perpendicularmente

ao centro do aparato. As medidas de distância total percorrida, número de entradas no centro e tempo de permanência no centro do aparato, assim como os mapas de percurso e ocupação foram realizados com o auxílio do software ANYmaze® (Stoelting, EUA). A área central do aparato foi definida como 20 cm x 20 cm (BAILEY, 2009). Após a retirada de cada animal, o aparato foi limpo com papel toalha umedecido com uma solução de etanol 10% e posteriormente seco com papel toalha, antes da exposição do próximo animal, para evitar que possíveis odores residuais pudessem alterar os comportamentos avaliados. O experimento foi realizado sob baixa luminosidade (12 lux).

Figura 12 – Representação do aparato utilizado no teste do campo aberto.



Legenda: Figura representativa do aparato utilizado no teste do campo aberto.

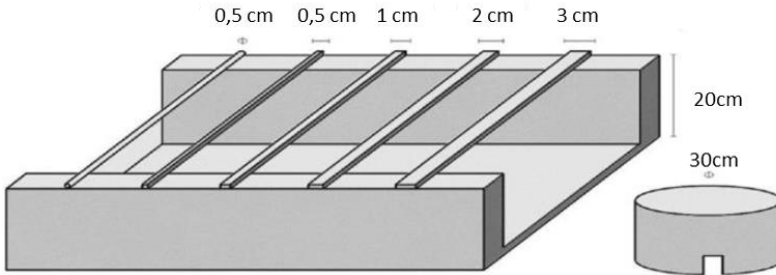
Fonte: Adaptado de Nilius e Flockerzi (2014).

2.4.6.2 Escore neurológico de severidade (ENS)

No segundo e no sexto dia após a última administração i.n. de NaDMDC, os animais foram submetidos ao teste do ENS. Este teste consiste de uma escala com 10 diferentes avaliações realizadas com o auxílio dos aparatos representados na Figura 13. Quando o animal apresenta déficit ou incapacidade de realizar a tarefa em questão, adiciona-se 1 ponto ao escore total do mesmo, como representado na Tabela 1. Este teste é utilizado para a mensuração do estado neurológico geral de roedores e foi descrito primeiramente por Shohami e colaboradores (1995), e

posteriormente padronizado em nosso laboratório por Schwarzbald e colaboradores (2010). Estudos prévios de nosso grupo têm demonstrado que o ENS é uma ferramenta útil para avaliar o prejuízo comportamental observado em modelos animais da DP (MATHEUS et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2017).

Figura 13 - Aparatos usados para a avaliação do escore neurológico de severidade.



Legenda: Figura representativa dos aparatos utilizados na avaliação do Escore Neurológico de Severidade.

Fonte: Schwarzbald e colaboradores (2010).

Tabela 1 - Parâmetros avaliados no Escore Neurológico de severidade.

Parâmetro testado	Capacidade	Incapacidade
Presença de paresia	0	1
Inabilidade em andar em linha reta	0	1
Perda do comportamento exploratório	0	1
Falha em sair do círculo (até 3 min)	0	1
Inabilidade de andar na trave de 3 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade de andar na trave de 2 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade de andar na trave de 1 cm (até 2 min)	0	1
Inabilidade em se equilibrar na trave de 0,5 cm (até 10 s)	0	1
Inabilidade de se equilibrar na trave redonda (até 10 s, 3 tentativas)	0	1
Perda do reflexo de sobressalto	0	1
Escore máximo	0	10

Fonte: Schwarzbald e colaboradores (2010).

2.4.6.3 Rotarod

No sétimo dia após a última administração i.n. de NaDMDC, realizou-se a avaliação da coordenação motora dos animais através do teste do rotarod (Insight[®], Ribeirão Preto, Brasil). O aparato consiste basicamente em um cilindro metálico, com ranhuras para facilitar a aderência dos animais, separado em 4 diferentes raias por discos de acrílico fosco, como demonstrado na Figura 14. Este cilindro está ligado a um motor que faz com que o mesmo gire em diferentes velocidades. Primeiramente, foi realizada a avaliação basal, antes da administração de NaDMDC; os animais que conseguiram permanecer no aparato durante 5 min em até 3 tentativas, a uma velocidade constante de 5 rpm, foram incluídos no estudo (90% dos animais). A avaliação realizada no sétimo dia utilizou aceleração; o teste iniciava-se em 5 rpm e

apresentava uma aceleração constante de $0,1 \text{ revolução/s}^2$, com a velocidade máxima (40 rpm) estabelecida de 5 min de latência para a queda (SHIOTSUKI et al., 2010).

Figura 14 – Aparato do Rotarod.



Fonte: INSIGHT (2017).

2.4.7 Análises *ex vivo*

Para a realização dos ensaios *ex vivo*, os animais foram anestesiados com isoflurano (2-3% a 100% de oxigênio) e eutanasiados por decapitação, em diferentes tempos, conforme descrito anteriormente, sendo realizada a coleta do BO e do estriado para as análises neuroquímicas. Para as análises por *Western blotting* e ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C até o momento das análises. Para a avaliação dos níveis de EROs e dano a membrana celular, avaliados em fatias, o tecido foi processado e a análise foi realizada imediatamente após a coleta das estruturas.

2.4.7.1 *Western blotting*

O ensaio de *Western blotting* foi realizado como descrito previamente (Oliveira et al., 2017). Em resumo, as amostras de

BO e estriado foram homogeneizadas em tampão de lise (50 mM Tris/HCl pH7.5; NaCl 150 mM; 1% NP-40/Igepal; 5% coquetel inibidor de protease; PMSF 0,5 mM). Centrifugadas por 20 min a 20000 g, a 3°C. O sobrenadante das amostras foi diluído em glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,004%, Tris-HCl 0,106 M, pH 6,85, com 2-mercaptoetanol 5%. As proteínas (20 µg/poço) foram separadas por gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE) usando um aparato Miniprotean tetra (Bio-Rad, CA, EUA). A eletroforese foi realizada com uma voltagem fixa de 200 volts por 50 minutos, ou até o corante ter alcançado o final do gel, utilizando-se para isso um tampão de corrida contendo 190 mM de glicina, 25 mM de Tris e 0,1% de SDS. Após a separação, as proteínas foram transferidas eletroforéticamente para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, do Inglês: *Polyvinylidene Fluoride*) previamente ativada com metanol, utilizando o aparato Mini Trans-Blot (Bio-Rad, CA, EUA), por 90 minutos a 100 volts e sob refrigeração. As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5%, lavadas e incubadas por aproximadamente 8 h com anticorpo primário anti-TH (1:5000, sc-25269, Santa Cruz Biotechnology). Após a retirada do anticorpo primário e lavagem, a membrana foi incubada com anticorpo secundário apropriado. A revelação foi realizada com solução quimioluminescente, utilizando o kit ECL™ (Amersham Biosciences, UK), seguida da detecção em aparelho fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, La Jolla, USA). Para controle de carregamento, utilizou-se a detecção da proteína β -actina, através da incubação das membranas com anticorpo primário anti- β -actina conjugado a peroxidase (A3854, Sigma-Aldrich, MO, EUA, 1:20000). A quantificação das bandas detectadas foi realizada no software Image Lab™ (Bio-Rad, La Jolla, USA).

2.4.7.2 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

Para a análise dos níveis de TNF- α no BO e estriado, as amostras foram colocadas em tampão fosfato (PBS) contendo Tween® 20 (0,05%), fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) (0,1 mM), ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) (10 mM), aprotinina (2 ng/ml) e cloreto de benzametônio (0,1 mM), e homogeneizadas. As amostras homogeneizadas foram centrifugadas a 6900 \times g por 10 minutos (4°C) e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C, para a futura análise. O conteúdo proteico total do

sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva padrão de calibração com albumina de soro bovino (BSA, do Inglês: *bovine serum albumin*) (0,05 a 0,5 mg/mL). Alíquotas de 100 µL foram utilizadas para mensurar as concentrações do TNF- α , através de kits de ELISA MAXTM Standard para camundongos (Cat 430903, BioLegend, San Diego, CA, EUA) de acordo com instruções do fabricante. As concentrações do TNF- α foram definidas pela interpolação de uma curva padrão de 7 pontos, por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) em um leitor de placas (Berthold Technologies, Apollo 8 – LB 912, KG, Alemanha). Os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

2.4.7.3 Ensaio de dano a membrana celular e medida da produção de espécies reativas de oxigênio

2.4.7.3.1 *Preparação das fatias*

Imediatamente após a coleta, o BO e o estriado dos animais foram colocados no tampão Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) (122 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.3 mM CaCl₂, 0.4 mM KH₂PO₄, 25 mM NaHCO₃ e 10 mM D-glicose) gelado e gaseificado com carbogênio (95% O₂ - 5% CO₂) para atingir pH 7,4. Com o auxílio de um fatiador de tecidos (Mcllwain), as estruturas foram fatiadas em secções transversas de 400 µm. As fatias foram pré-incubadas em tampão KRB por 30 min a 37°C.

2.4.7.3.2 *Ensaio de dano a membrana celular*

O iodeto de propídeo (IP) é uma molécula polar que normalmente não atravessa a membrana de células intactas, somente em células mortas ou que estão em processo de necrose. Dentro da célula o IP se complexa com o DNA e emite uma intensa fluorescência vermelha (630 nm) quando excitado por luz verde (495 nm). As fatias dos tecidos foram incubadas com uma solução contendo 7 µg/mL de IP, durante 30 minutos, a 37°C. Posteriormente, as fatias foram lavadas com tampão KRB e a quantificação da fluorescência foi lida na Multileitora Infinite M200 (Tecan). As imagens representativas foram capturadas com um microscópio padrão invertido (Olympus IX 71) usando um conjunto

de filtros de rodamina, acoplado a uma câmera Olympus C5060 (PIERMARTIRI et al., 2010).

2.4.7.3.3 Medida dos níveis de EROs

Para mensurar a produção de EROs, utilizou-se a sonda molecular 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA). As fatias de BO e estriado foram incubadas com uma solução de 80 µM de H₂DCFDA, por 45 min. A H₂DCFDA atravessa a membrana celular e é hidrolisada por esterases intracelulares para a forma não-fluorescente 2'-7'-diclorodi-hidrofluoresceína (DCFH), a qual reage com EROs intracelulares para formar a 2'-7'-diclorofluoresceína (DCF), a qual possui fluorescência verde. As fatias foram expostas à H₂DCFDA 80 µM durante 30 minutos em KRB, a 37°C. Em seguida as fatias foram lavadas duas vezes com KRB. A análise da produção de EROs foi feita através da leitura na Multileitora Infinite M200 (Tecan), com excitação de 585 nm e emissão de 520 nm. As imagens representativas foram capturadas com um microscópio padrão invertido (Olympus IX 71) usando um conjunto de filtros de rodamina, acoplado a uma câmera Olympus C5060 (DAL-CIM et al., 2013).

2.4.8 Análise estatística

Para a análise dos dados da temperatura corporal foi realizada a análise de variância (ANOVA) com medidas repetidas, seguida do teste post-hoc de Newman-Keuls. Os resultados obtidos no teste do ENS nos experimentos 1, 2, 3 e 5 foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para análise dos demais resultados obtidos nos experimentos 1, 2, 3 e 5 utilizou-se o teste t de Student, uma vez que os valores apresentaram distribuição normal quando avaliados no teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise dos resultados do teste do campo aberto e rotarod do experimento 4, os quais apresentaram uma distribuição normal, utilizou-se a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls. Os dados do ENS do experimento 4 foram primeiramente submetidos a ranking por alinhamento e, posteriormente, analisados pela ANOVA de duas vias, seguido pelo teste de Mann-Whitney, com correção de Bonferroni para múltiplas comparações (Higgins, 1990, 1994; Wobbrok, 2011). Todas as análises estatísticas foram realizadas

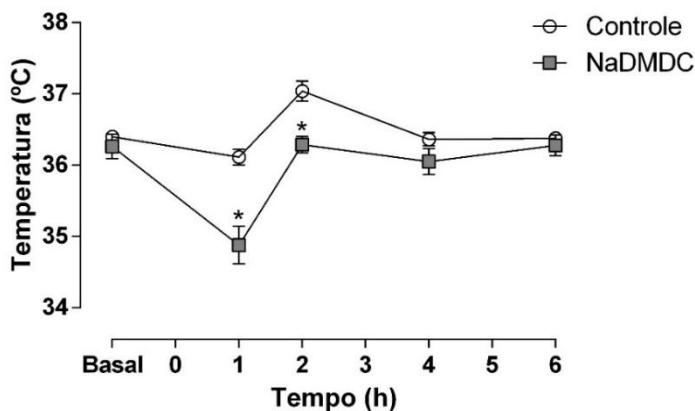
através do uso do software STATISTICA® versão 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA). Valores de $P < 0,05$ foram considerados como indicativos de diferenças estatisticamente significativas.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 A administração intranasal de NaDMDC induz hipotermia e déficits motores em camundongos

A Figura 15 apresenta os dados da mensuração da temperatura corporal basal e após diferentes intervalos da administração i.n. de NaDMDC. A ANOVA com medidas repetidas indicou um efeito significativo dos fatores tratamento [F (1, 14)=24,0, $P<0,05$], tempo [F(1,14)=18,0, $P<0,05$] e interação [F(1,14)=5,6, $P<0,05$]. A análise de múltiplas comparações demonstrou que houve uma redução significativa ($P<0,05$) na temperatura corporal do grupo NaDMDC em comparação ao grupo Controle nos tempos de 1 h e 2 h.

Figura 15 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC (protocolo 1) sobre a temperatura corporal de camundongos.

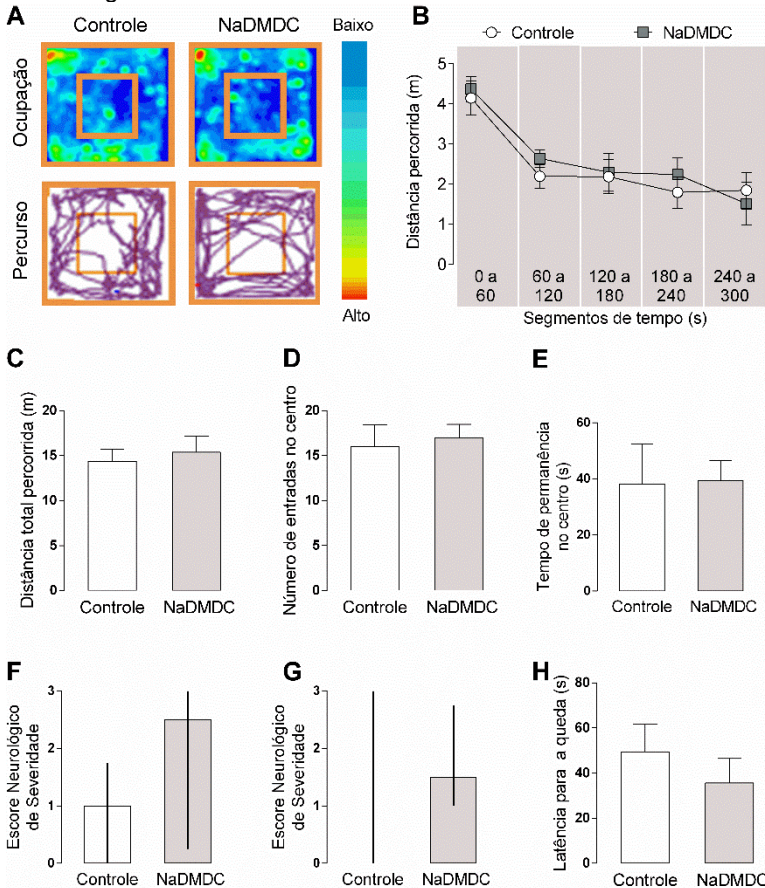


Legenda: Os animais ($n=7-9$ /grupo) receberam uma única administração de 1 mg/narina de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). A temperatura corporal foi mensurada 1 h antes (medida basal) e 1, 2, 4 e 6 h após a administração i.n. de NaDMDC. Análise estatística realizada por ANOVA de 2 vias com medidas repetidas, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls; os dados representam a média \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle no mesmo tempo.

O protocolo 1 de administração do NaDMDC (1 administração), não provocou alterações comportamentais

significativas ($P>0,05$) nos parâmetros avaliados no campo aberto (Fig. 16, A, B, C, D e E), ENS (Fig. 16, F e G) e rotarod (Fig. 16 H), em comparação ao grupo Controle.

Figura 16 – Efeitos do protocolo 1 de administração intranasal de NaDMDC sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.



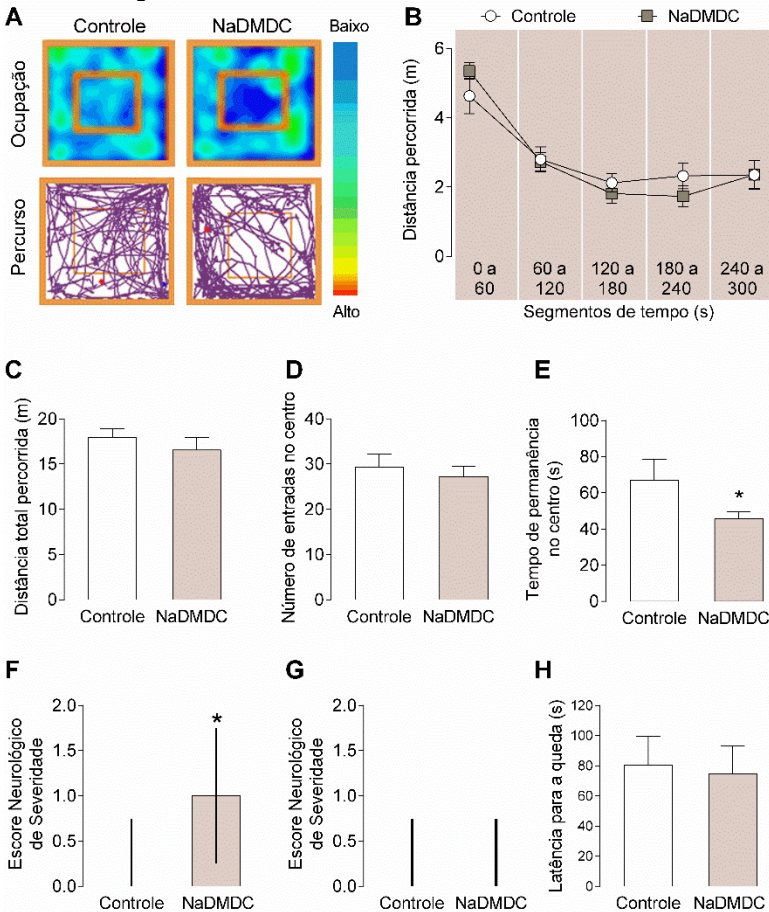
Legenda: Os animais ($n=7-9$ /grupo) receberam uma única administração de 1 mg/narina de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). Após a administração de NaDMDC, os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (A-E, dia 4), escore neurológico de severidade (ENS) (F, G, dias 2 e 6, respectivamente) e rotarod (H, dia 7).

Continuação da legenda da Figura 16: (A) figuras representativas da ocupação e do percurso dos animais no teste do campo aberto. A análise estatística realizada pelo teste t de *Student* para os parâmetros analisados no campo aberto e rotarod; os dados representam a média \pm EPM. Para a análise dos dados do ENS foi utilizado o Teste de Mann-Whitney; os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil.

O protocolo 2 de administração de NaDMDC (administração em 2 dias consecutivos) (Figura 17) também não provocou alterações significativas nos parâmetros locomotores avaliados no teste do campo aberto; distância total percorrida e número de entradas no centro ($P > 0,05$), em comparação ao grupo Controle. No entanto, os animais que receberam NaDMDC permaneceram por menos tempo no centro do aparato (Fig. 17 E) ($P < 0,05$), indicativo de comportamento do tipo ansiogênico. Além disso, este protocolo de administração levou ao aumento do ENS nos animais que receberam NaDMDC ($P < 0,05$), no dia 2 (Fig. 17 F). Este prejuízo, no entanto, foi revertido até o sexto dia (Fig. 17 G), quando não foram mais observadas diferenças no ENS entre os grupos Controle e NaDMDC ($P > 0,05$). Ainda, o tempo de latência para a queda no rotarod (Fig. 17 H) também não foi alterado neste protocolo de duas administrações de NaDMDC ($P > 0,05$).

O protocolo 3 de administração de NaDMDC (4 dias consecutivos de administração) reduziu significativamente a locomoção dos animais no teste do campo aberto em comparação ao grupo Controle, como demonstrado pela redução da distância total percorrida (Fig. 18 C) e do número de entradas no centro (Fig. 18 D) ($P < 0,05$). O tempo de permanência no centro do aparato (Fig. 18 E) não foi modificado ($P > 0,05$). A exemplo do observado no protocolo 2, a administração de NaDMDC em 4 dias consecutivos provocou um aumento da pontuação no ENS no dia 2 ($P < 0,05$) (Fig. 18 F) indicativo de prejuízos da função neurológica dos animais. Entretanto, neste protocolo não foi observada reversão desta resposta até o sexto dia (Fig 18 G), sendo que o ENS permaneceu significativamente elevado nos animais que receberam NaDMDC em comparação com os animais do grupo Controle. O protocolo 3 levou também a um prejuízo na coordenação motora dos animais, como demonstrado pela redução no tempo de latência para a queda nos animais que receberam NaDMDC ($P < 0,05$) no teste do rotarod (Fig. 18 H).

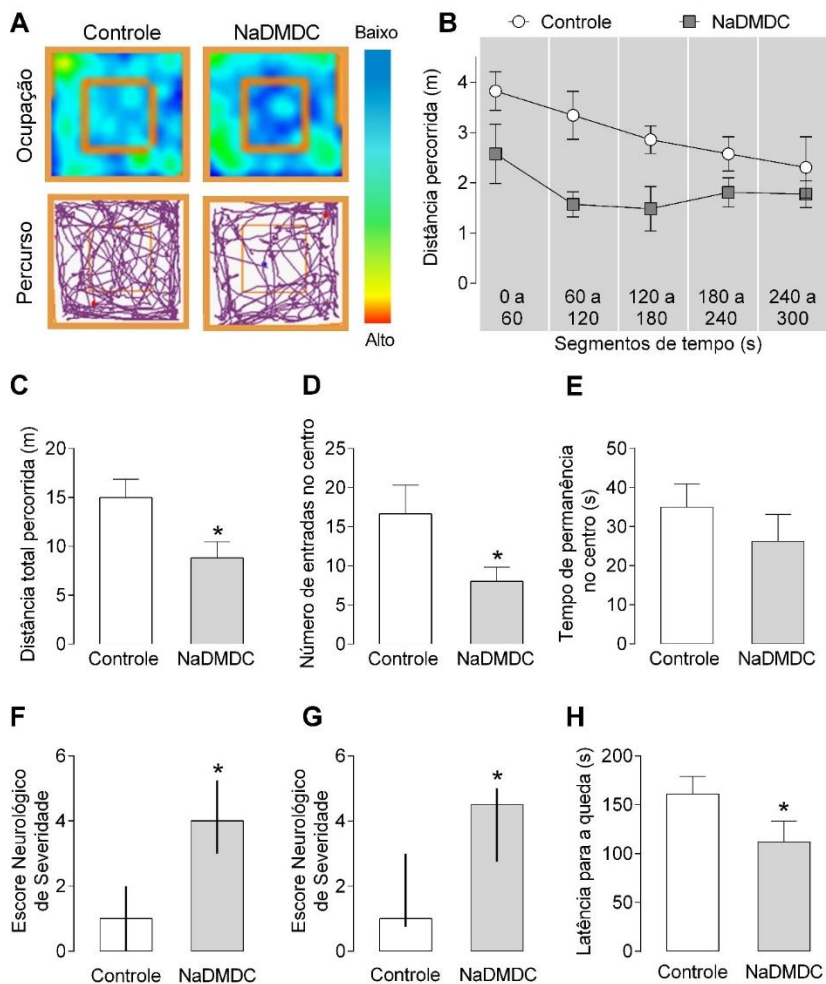
Figura 17 – Efeitos do protocolo 2 de administração intranasal de NaDMDC sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.



Legenda: Os animais (n=7-9/grupo) foram tratados por 2 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). Após o último dia de administração os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (A-E, dia 4), escore neurológico de severidade (ENS) (F, G, dias 2 e 6, respectivamente) e rotarod (H, dia 7). (A) figuras representativas da ocupação e do percurso no teste do campo aberto. Análise estatística realizada pelo teste t de *Student* para os parâmetros analisados no campo aberto e rotarod; os dados representam a média \pm EPM.

Continuação da legenda da Figura 17: Para a análise dos dados do ENS foi utilizado o teste de Mann-Whitney; os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

Figura 18 - Efeitos do protocolo 3 de administração intranasal de NaDMDC sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.



Legenda: Os animais ($n=7-9$ /grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina).

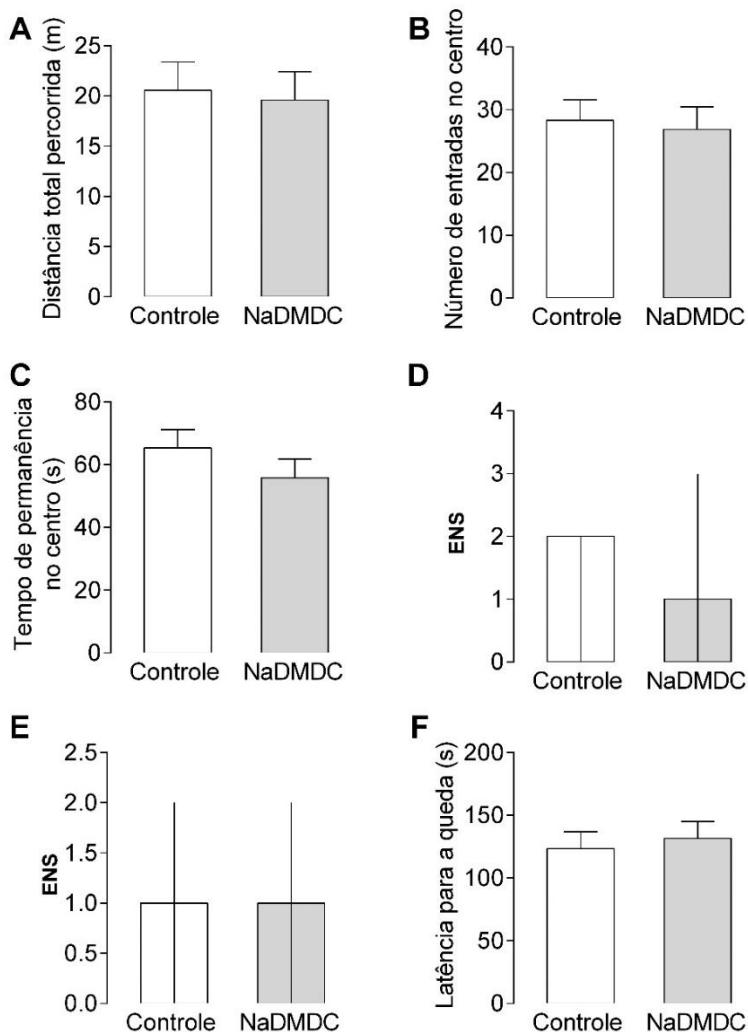
Continuação da legenda da Figura 18: Após o último dia de administração os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (A-E, dia 4), escore neurológico de severidade (ENS) (F, G, dias 2 e 6, respectivamente) e rotarod (H, dia 7). (A) figuras representativas da ocupação e do percurso no teste do campo aberto. Análise estatística realizada pelo teste t de Student para os parâmetros analisados no campo aberto e rotarod; os dados representam a média \pm EPM. Para a análise dos dados do ENS foi utilizado o teste de Mann-Whitney; os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

Estes dados demonstram que 4 administrações em dias consecutivos de NaDMDC (1 mg/kg, i.n.) (protocolo 3) induziu prejuízos nas funções motora e neurológica de camundongos, que permaneceram até o sétimo dia após a última administração. Tendo em vista estes resultados, o protocolo 3 de administração foi selecionado para a continuidade dos estudos neuroquímicos de avaliação da neurotoxicidade induzida pela administração i.n. do NaDMDC.

2.5.2 A administração de NaDMDC por via sistêmica não prejudica a função motora e estado neurológico de camundongos

A Figura 19 ilustra os resultados obtidos com a administração i.p. de NaDMDC. A administração i.p. de NaDMDC (50 mg/kg/dia), durante quatro dias consecutivos, não alterou de maneira significativa o desempenho dos animais nos testes do campo aberto (distância total percorrida, entradas no centro e tempo de permanência no centro, Fig. 19, A, B e C), ENS (Fig. 19, D e E) e rotarod (Fig. 19 F), em comparação ao grupo Controle ($P > 0,05$).

Figura 19 – Efeitos da administração intraperitoneal de NaDMDC sobre sobre parâmetros motores e estado neurológico geral de camundongos.



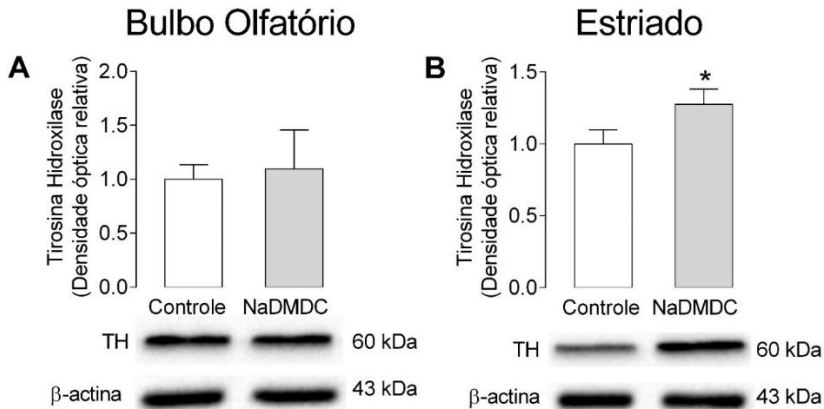
Legenda: Os animais (n=6-7/grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com NaDMDC, por via intraperitoneal [50 mg/kg/dia de NaDMDC ou Controle (10 mL/kg)]. Após o último dia de administração os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (A-C, dia 4), escore neurológico de severidade (ENS) (D, E, dias 2 e 6, respectivamente) e rotarod (F, dia 7).

Continuação da legenda da Figura 19: Análise estatística realizada pelo teste t de *Student* para os parâmetros analisados no campo aberto e rotarod; os dados representam a média \pm EPM. Para a análise dos dados do ENS foi utilizado o teste de Mann-Whitney; os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil.

2.5.3 A administração intranasal de NaDMDC provoca aumento no imunoconteúdo de tirosina hidroxilase no estriado de camundongos

A Figura 20 apresenta os resultados da imunodeteccção de TH obtida por *Western blotting* no sétimo dia após a última administração i.n. de NaDMDC. Neste tempo, não houve diferença significativa no imunoconteúdo de TH no BO ($P > 0,05$) (Fig. 20 A). Entretanto, foi observado um aumento no imunoconteúdo de TH ($P < 0,05$) no estriado (Fig. 20 B) de animais que receberam NaDMDC, em comparação ao grupo Controle.

Figura 20 – Efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase no bulbo olfatório e estriado de camundongos.

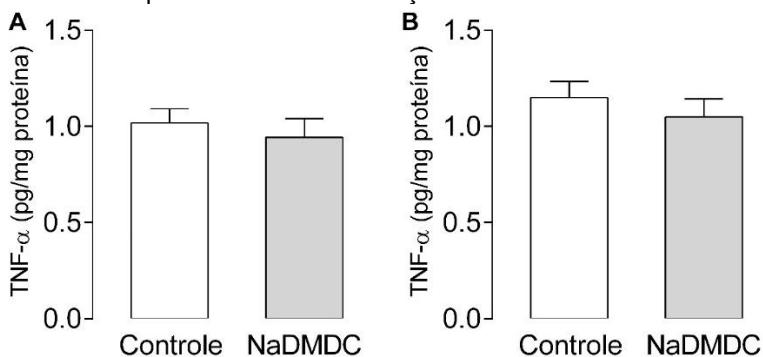


Legenda: Os animais ($n=7-8$ /grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). Após 7 dias decorridos da última administração o bulbo olfatório (A) e o estriado (B) foram coletados para análise do imunoccontido de TH por *Western Blotting*.

Continuação da legenda da Figura 20: Os dados representam a média \pm EPM e a avaliação estatística foi realizada através do Teste t de *Student*. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle.

A Figura 21 apresenta os dados da quantificação dos níveis de TNF- α no sétimo dia após o término do tratamento com NaDMDC. No tempo avaliado, a administração de NaDMDC não alterou de maneira significativa os níveis desta citocina no BO (Fig. 21 A) e estriado (Fig. 21 B) dos animais ($P > 0,05$).

Figura 21 – Efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de TNF- α no bulbo olfatório e estriado de camundongos avaliados no sétimo dia após a última administração.



Legenda: Os animais ($n=7$ /grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). Após 7 dias decorridos da última administração, o bulbo olfatório (A) e o estriado (B) foram coletados para análise dos níveis de TNF- α por ELISA. Os dados representam a média \pm EPM e a avaliação estatística foi realizada através do teste t de *Student*.

2.5.4 O tratamento com L-DOPA e apomorfina atenua os déficits na função motora e estado neurológico induzidos pela administração intranasal do NaDMDC

A figura 22 apresenta os efeitos comportamentais do tratamento com L-DOPA/benserazida (100 mg/kg/25 mg/kg, v.o.) ou Controle, 1 h antes da avaliação, em animais que receberam a administração i.n. de NaDMDC ou Controle em 4 dias

consecutivos (protocolo 3). No parâmetro distância total percorrida (Fig. 22 A), a ANOVA de duas vias indicou ausência de efeitos significativos dos fatores pré-tratamento (NaDMDC/Controle) [$F(3,21)=1,58$, $P>0,05$] e tratamento (L-DOPA-benserazida/Controle) [$F(3,21)=2,38$, $P>0,05$]. No entanto, a interação entre estes fatores foi significativa [$F(3,21)=32,69$, $P<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que os animais do grupo NaDMDC apresentaram uma redução significativa ($P<0,05$) da distância total percorrida em comparação ao grupo Controle. No entanto, os animais do grupo NaDMDC + L-DOPA apresentaram um aumento significativo ($P<0,05$) na locomoção em relação ao grupo NaDMDC, demonstrando que o tratamento com L-DOPA foi capaz de atenuar este prejuízo locomotor induzido pelo ditiocarbamato. Ainda, os animais que receberam somente L-DOPA também apresentaram uma redução significativa em relação ao Controle (Fig. 22 A).

No parâmetro número de entradas no centro (Fig. 22 B) e tempo de permanência no centro (Fig. 22 C), também não foram observados efeitos significativos dos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,21)=0,006$, $P>0,05$, e $F(3,21)=0,38$, $P>0,05$, respectivamente] e L-DOPA-Benserazida/Controle [$F(3,21)=1,34$, $P>0,05$, e $F(3,21)=1,48$, $P>0,05$, respectivamente]. Entretanto, foi observado um efeito significativo do fator interação [$F(3,21)=12,93$, $P<0,05$, e $F(3,21)=7,46$, $P<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls demonstrou uma redução significativa ($P<0,05$) destes parâmetros no grupo L-DOPA em comparação ao grupo Controle (Fig. 22 B).

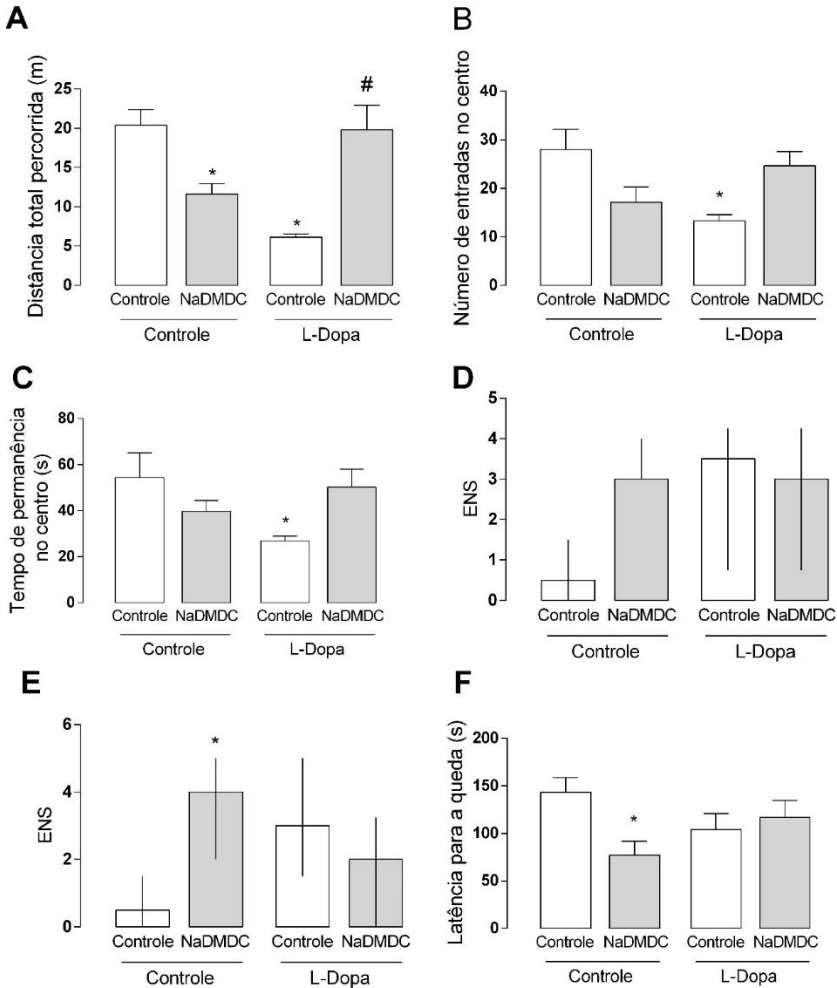
Os resultados obtidos no ENS nos dias 2 (Fig. 22 D) e 6 (Fig. 22 E), após a última administração de NaDMDC, não apresentaram efeitos significativos dos fatores NaDMDC/Controle [dia 2: $F(3,21)=2,67$, $P>0,05$; dia 6: $F(3,21)=2,03$, $P>0,05$,] e L-DOPA-benserazida/Controle [dia 2: $F(3,21)=0,88$, $P>0,05$, e dia 6: $F(3,21)=0,056$, $P>0,05$]. No dia 2, não houve interação significativa entre os fatores pré-tratamento versus tratamento [$F(3,21)=3,83$, $P>0,05$], observando-se um efeito significativo da interação entre estes fatores no dia 6 [$F(3,21)=8,3$, $P<0,05$]. As múltiplas comparações realizadas através do teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni demonstraram que só houve diferença significativa ($P<0,05$) entre os grupos Controle e NaDMDC no sexto dia, sendo que a administração do ditiocarbamato levou ao aumento do ENS.

A Figura 22 F apresenta os dados obtidos no teste do rotarod. Não foram observados efeitos significativos dos fatores pré-tratamento (NaDMDC/Controle) [$F(3,21)=2,17$, $P>0,05$] e tratamento (L-DOPA-benserazida/Controle) [$F(3,21)=0,04$, $P>0,05$], observando-se novamente um efeito significativo para o fator interação [$F(3,21)=5,17$, $P<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que houve uma redução significativa no tempo de latência para a queda no grupo NaDMDC em comparação ao grupo Controle.

Os resultados dos efeitos da administração do agonista dopaminérgico apomorfina sobre as alterações comportamentais induzidas pelo NaDMDC estão apresentados na Figura 23. A ANOVA de duas vias demonstrou que não houve efeito significativo dos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,21)=2,37$, $P>0,05$] e Apomorfina/Controle [$F(3,21)=0,37$, $P>0,05$] sobre a locomoção dos animais (Fig. 23 A), no entanto a interação destes fatores foi significativa [$F(3,21)=11,8$, $P<0,05$]. A análise *post-hoc* revelou uma redução significativa ($P<0,05$) na locomoção dos animais do grupo NaDMDC, em comparação aos animais do grupo Controle. O tratamento com apomorfina reverteu esse prejuízo, como demonstrado pelo aumento significativo da distância total percorrida no grupo NaDMDC + Apomorfina, em comparação ao grupo NaDMDC.

O número de entradas no centro do aparato (Fig. 23 B) também não foi alterado significativamente pelos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,21)=0,41$, $P>0,05$] e Apomorfina/Controle [$F(3,21)=0,23$, $P>0,05$], mas sim pela interação entre estes [$F(3,21)=12,07$, $P<0,05$]. O teste post-hoc de Newman-Keuls demonstrou que tanto a administração de NaDMDC quanto de apomorfina reduziram significativamente ($P<0,05$) este parâmetro locomotor. Entretanto, os animais do grupo NaDMDC + Apomorfina, não diferiram significativamente do grupo controle.

Figura 22 – Efeitos do tratamento com L-DOPA sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.



Legenda: Os animais (n=6-7/grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). Após o último dia de administração os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (A-C, dia 4), escore neurológico de severidade (ENS) (D, E, dias 2 e 6, respectivamente) e rotarod (F, dia 7). Os animais foram tratados com L-DOPA/benserazida (100 mg/kg/25 mg/kg, v.o.) 1 h antes de cada avaliação comportamental.

Continuação da legenda da Figura 22: Usou-se a ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls para os parâmetros analisados no campo aberto e rotarod; os dados representam a média \pm EPM. Para a análise do ENS os dados foram primeiramente submetidos a ranking por alinhamento e posteriormente analisados por ANOVA de duas vias, e as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni; os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil, mínimo e máximo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo NaDMDC.

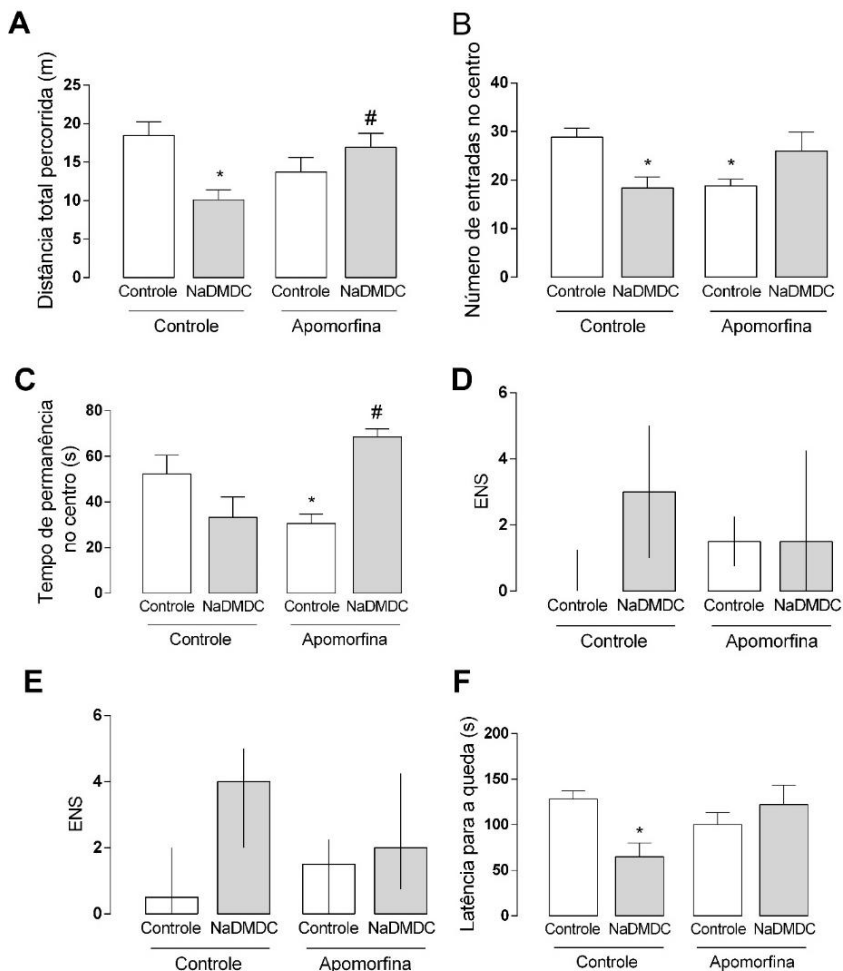
Da mesma forma, o tempo de permanência no centro (Fig. 23 C) não foi alterado de maneira significativa pelos fatores pré-tratamento (NaDMDC/Controle) [$F(3,21)=1,86$, $P>0,05$] e tratamento (Apomorfina/Controle) [$F(3,21)=0,94$, $P>0,05$]. Entretanto, foi observado um efeito significativo para o fator interação [$F(3,21)=16,87$, $P<0,05$]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que houve uma redução deste parâmetro no grupo Apomorfina em relação ao grupo Controle ($P<0,05$). Ainda, o tratamento com apomorfina em animais que receberam NaDMDC (grupo NaDMDC + Apomorfina) demonstrou aumentar significativamente ($P<0,05$) o tempo que os animais permaneceram no centro do aparato em comparação ao grupo NaDMDC.

Com relação ao ENS realizado no dia 2 (Fig 23 D), a ANOVA revelou efeito significativo do fator NaDMDC/Controle [$F(3,21)=8,59$, $P<0,05$], mas não do fator Apomorfina/Controle [$F(3,21)=0,27$, $P>0,05$] ou da interação [$F(3,21)=2,55$, $P>0,05$]. A análise de múltiplas comparações revelou que não houve diferença significativa do ENS entre os grupos. No ENS realizado no dia 6 (Fig 23 E), foi observado um efeito significativo somente para o fator NaDMDC/Controle [$F(3,21)=7,48$, $P<0,05$], enquanto o fator Apomorfina/Controle [$F(3,21)=0,41$, $P>0,05$] e a interação [$F(3,21)=2,27$, $P>0,05$] não foram significativos. Ainda, a comparação entre os grupos não demonstrou diferença significativa ($P>0,05$).

No teste do rotarod (Fig. 23 F), a ANOVA de duas vias indicou um efeito significativo para a interação entre os fatores [$F(3,21)=7,64$, $P<0,05$], mas não dos fatores individualmente - NaDMDC/Controle [$F(3,21)=1,79$, $P>0,05$] e Apomorfina/Controle [$F(3,21)=0,9$, $P>0,05$]. Neste parâmetro, mais uma vez o tratamento com NaDMDC demonstrou provocar um déficit na

coordenação motora, através da redução significativa ($P < 0,05$) do tempo de latência para queda do grupo NaDMDC em comparação ao grupo Controle. Além disso, o tratamento com apomorfina demonstrou ser eficaz em reverter este déficit nos animais, como demonstrado pela diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos NaDMDC e NaDMDC + Apomorfina.

Figura 23 – Efeitos do tratamento com apomorfina sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.



Legenda: Os animais ($n=6-7$ /grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 μ L/narina). Após o último dia de administração os animais foram submetidos aos testes de campo aberto (A-C, dia 4), escore neurológico de severidade (ENS) (D, E, dias 2 e 6, respectivamente) e rotarod (F, dia 7). Os animais foram tratados com apomorfina (0,5 mg/kg, s.c.) 30 min antes de cada avaliação comportamental.

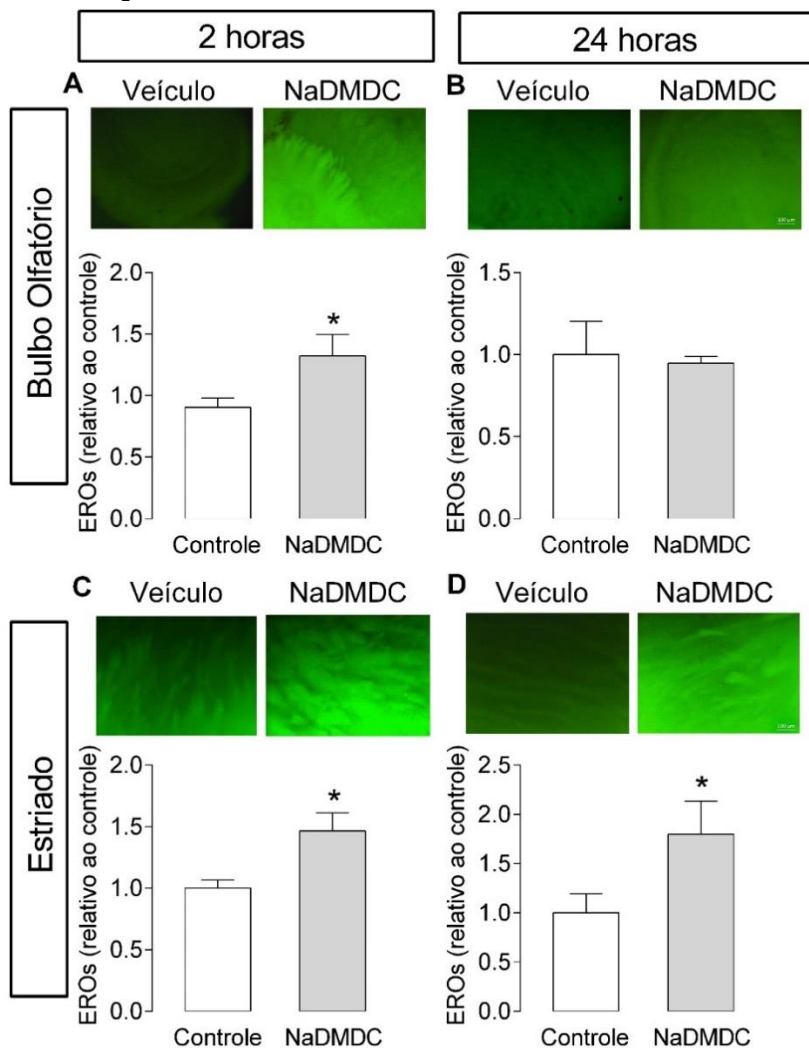
Continuação da legenda da Figura 23: Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls para os parâmetros analisados no campo aberto e rotarod; os dados representam a média \pm EPM. Para a análise do ENS os dados foram primeiramente submetidos a ranking por alinhamento e posteriormente analisados por ANOVA de duas vias, e as múltiplas comparações foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni; os dados representam a mediana \pm intervalo interquartil, mínimo e máximo. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo NaDMDC.

2.5.5 A administração intranasal de NaDMDC induz aumento no estresse oxidativo e dano celular em estruturas encefálicas de camundongos

A Figura 24 apresenta os resultados da quantificação relativa dos níveis de EROs no BO (Fig. 24, A e B) e estriado (Fig. 24, C e D), 2 e 24 horas após a última administração de NaDMDC. No BO, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de EROs, 2 h (Fig 24 A), mas não 24 horas após a última administração de NaDMDC em comparação ao grupo Controle. Entretanto, a administração de NaDMDC provocou um aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de EROs no estriado, 2 h e 24 h após a última administração de NaDMDC, em comparação aos animais que receberam veículo.

Os resultados da avaliação do dano celular, pela incorporação de IP, estão apresentados na Figura 25. A administração de NaDMDC não alterou significativamente ($P > 0,05$) a incorporação de IP no BO (Fig. 25, A e B) nos tempos avaliados. Por outro lado, houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na incorporação de IP no estriado no tempo de 2 h, mas não de 24 h.

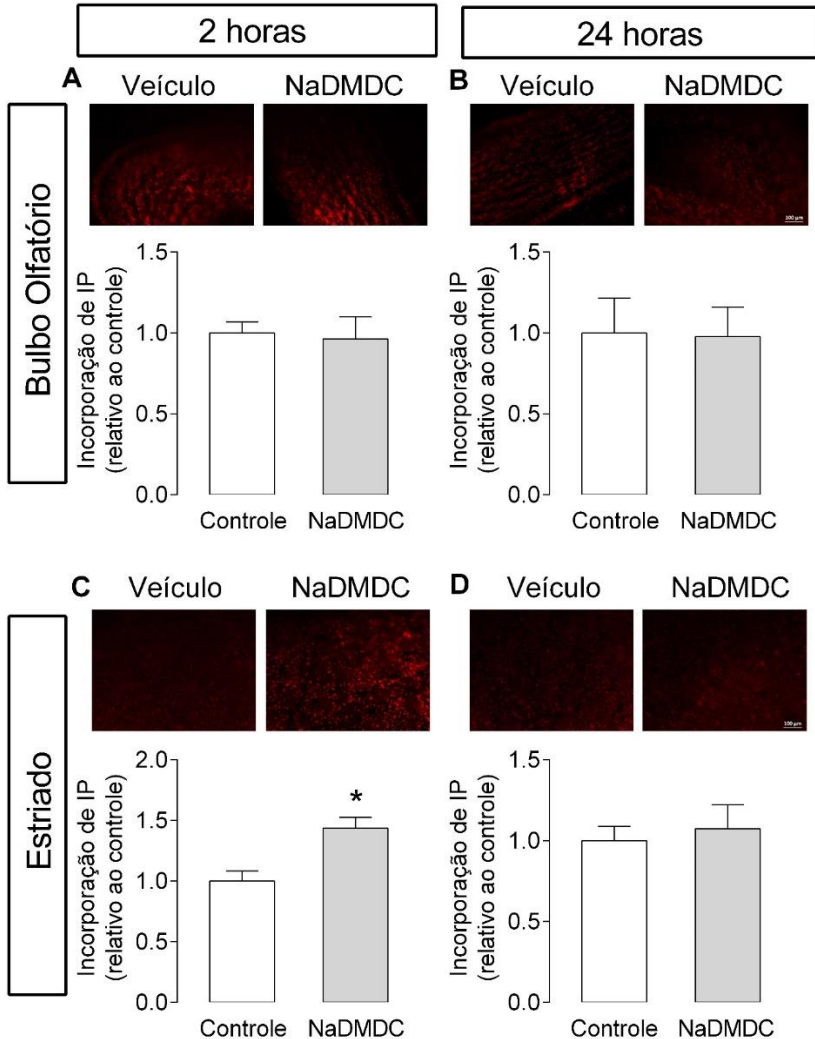
Figura 24 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de espécies reativas de oxigênio no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



Legenda: Os animais (n=5/grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle. Após 2 h (A e C) e 24 h (B e D) decorridas da última administração, o bulbo olfatório (A e B) e o estriado (C e D) foram coletados para a análise através da incubação das fatias dos tecidos com a sonda molecular 2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína.

Continuação da legenda da Figura 24: Os dados foram normalizados pela média do grupo Controle e estão representados pela média \pm EPM; a análise estatística foi realizada através do teste t de *Student*. * $P < 0,05$ comparados ao grupo Controle.

Figura 25 – Efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre o dano a membrana celular no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



Legenda: Os animais (n=5/grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle.

Continuação da legenda da Figura 25: Após 2 horas (A e C) e 24 horas (B e D) decorridas da última administração, o bulbo olfatório (A e B) e o estriado (C e D) foram coletados para a análise através da incubação das fatias dos tecidos com Iodeto de Propídio (IP). Os dados foram normalizados pela média do grupo Controle e estão representados pela média \pm EPM; a análise estatística foi realizada através do Teste t de *Student*. * P < 0,05 comparados ao grupo Controle.

2.6 DISCUSSÃO

Embora a relação entre a exposição a pesticidas e o aumento no risco do desenvolvimento da DP já venha sendo estudada desde a década de 1980, o envolvimento do ziram na etiopatologia desta doença é relativamente recente. Devido a este fato, existem poucos estudos buscando esclarecer os mecanismos pelos quais esta toxina ambiental atinge o SNC e provoca efeitos tóxicos que possam estar envolvidos com o desenvolvimento da DP. Neste sentido, este trabalho é o primeiro estudo a demonstrar a toxicidade do NaDMDC administrado pela via i.n., uma via que está intimamente relacionada com a exposição ambiental real a que os indivíduos são submetidos, seja de forma ocupacional ou residencial, e que já demonstrou ser uma porta de entrada de diversas substâncias para o SNC. A administração i.n. de NaDMDC em camundongos levou a hipotermia, déficits motores e prejuízos na função neurológica. Estes déficits comportamentais parecem estar relacionados a danos nas vias dopaminérgicas, especialmente na via nigroestriatal, os quais podem ser provocados pelo aumento da produção de EROs.

Inicialmente, demonstrou-se que a administração de NaDMDC provocou uma reação de hipotermia 1 h após a sua administração nos animais, a qual apresentou-se reversível, desaparecendo na segunda hora. O aparecimento de hipotermia após a administração aguda de toxinas já está bem descrito na literatura. Diferentes substâncias têm a capacidade de evocar este tipo de resposta, como metais (zinco, cádmio e chumbo), solventes orgânicos (álcoois de cadeia curta, sulfolano) e pesticidas (GORDON, 1991). Além disso, nosso grupo de pesquisa já demonstrou que a administração i.n. de MPTP provocou uma hipotermia significativa que se iniciou 1 h e permaneceu até a sexta hora após a administração de MPTP (AGUIAR, 2011).

A redução da temperatura corporal após uma intoxicação aguda tem sido caracterizada como a redução da produção metabólica de calor e da vasodilatação periférica. Os animais podem apresentar um comportamento de busca a um ambiente com menor temperatura, para potencializar a hipotermia. Este mecanismo pode ser neuroprotetor, uma vez que já foi demonstrado que o aumento da temperatura corporal pode

umentar a sensibilidade à toxicidade de xenobióticos (DOULL, 1972; WEIHE, 1973). O papel protetor da hipotermia pode ocorrer através da redução do metabolismo geral e, conseqüentemente, da produção de sintomas da toxicidade, além da redução da taxa de respiração, que, no caso de o indivíduo estar em contato com alguma toxina inalável, irá reduzir a sua captação (GORDON, 1991).

A hipotermia também tem sido relacionada com menores danos oxidativos, e tem sido estudada para o tratamento de traumatismo craniano, elevação da pressão intracraniana, acidente vascular cerebral, hemorragia subaracnóidea, lesão da medula espinal, entre outros (GORDON, 1991). Sendo assim, a redução da temperatura corporal após a administração de NaDMDC pode ter levado a diminuição dos efeitos tóxicos deste ditiocarbamato, o que pode ser um viés, tendo em vista que espécies maiores, como o ser humano, podem não ter esta mesma resposta neuroprotetora (KARNATOVSKAIA; WARTENBERG ; FREEMAN, 2014).

Uma única administração de NaDMDC (1 mg/narina), embora seja capaz de levar a uma hipotermia, não foi suficiente para provocar alterações nos comportamentos motores avaliados neste estudo. Com o intuito de não elevar a dose diária de NaDMDC e levando em consideração a exposição crônica a que são submetidos diariamente os indivíduos que tem contato com este tipo de substância, optou-se pelo aumento do número de administrações em dias consecutivos, em vez do aumento da dose. Sendo assim, com duas administrações em dias consecutivos, o NaDMDC foi capaz de induzir um déficit neurológico temporário, caracterizado pelo aumento do ENS no dia 2, mas não no dia 6, além de um comportamento do tipo ansiogênico no campo aberto, indicado pela menor exploração da área central do aparato.

O ENS foi primeiramente descrito por Shohami e colaboradores (1995), como um teste para a avaliação do estado neurológico geral de roedores em modelos animais de traumatismo craniano e lesão cerebral, utilizando tarefas relacionadas a habilidades motoras, equilíbrio e estado de alerta do animal. Este teste primeiramente consistia em 25 diferentes tarefas, posteriormente foi modificado por Beni-Adani e colaboradores (2001), quando passou a ter somente 10 tarefas diferentes. Beni-Adani e colaboradores (2001) demonstraram que

existe uma correlação entre a gravidade do dano cerebral e o aumento do ENS através de técnicas de ressonância magnética e histologia em camundongos. Este teste foi padronizado em nosso laboratório por Schwarzbald e colaboradores (2010), ainda na avaliação de modelos animais de traumatismo craniano. No entanto, estudos recentes do nosso laboratório vêm demonstrando que o ENS configura uma ferramenta útil para mensurar o estado neurológico geral de animais em modelos experimentais da DP (MATHEUS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2017). Neste sentido, o aumento do ENS nos animais no segundo dia, e o desaparecimento deste efeito até o sexto dia após a última administração, indica que a intoxicação aguda pode gerar alterações comportamentais reversíveis, possivelmente através de modulações na neurotransmissão, sem perdas neuronais significativas, que implicariam em alterações comportamentais duradouras.

O protocolo 2 de administração de NaDMDC induziu um comportamento tipo ansiogênico nos animais, caracterizado pela redução no tempo de permanência no centro do aparato do campo aberto. O teste do campo aberto foi descrito para avaliação da emocionalidade em roedores por Hall (1934), desde então este teste tem se popularizado para a avaliação de diversos parâmetros, como a atividade locomotora, a ansiedade e a sedação. Este teste tem se mostrado útil não somente para avaliação de roedores, mas também de outras espécies, como bois, porcos, cordeiros, coelhos, aves e primatas. Quando os animais são liberados para livre exploração do aparato, existe uma preferência espontânea pela exploração da periferia em comparação ao centro do aparato, um comportamento chamado de tigmotaxia. O aumento do tempo e da distância percorrida na periferia está relacionado a maiores índices de ansiedade, e o tratamento dos animais com drogas ansiolíticas, como benzodiazepínicos, promove um aumento no tempo e distância percorrida no centro do aparato. O aumento das respostas de ansiedade no campo aberto pode ser desencadeado por dois fatores: i) o isolamento social, já que estes animais são separados do restante do grupo no momento do teste; ii) e a agorafobia, tendo em vista que o aparato geralmente é muito maior em relação a caixa moradia em que este animal é mantido (PRUT; BELZUNG, 2003; BAILEY, 2009).

A indução do comportamento tipo ansiogênico pela administração i.n. do NaDMDC é de grande importância para este trabalho devido ao fato de que transtornos de ansiedade (como ansiedade social e transtorno de pânico) são muito frequentes em indivíduos com a DP, provocando grande impacto na qualidade de vida destes pacientes (PREDIGER et al., 2012b). O surgimento da ansiedade ocorre antes do aparecimento dos sintomas motores da DP e pode estar associado a degeneração da via dopaminérgica mesolímbica, a qual envia projeções para a amígdala, estrutura chave no controle da ansiedade. Além disso, a neurodegeneração de outras estruturas envolvendo outros sistemas de neurotransmissão, como o noradrenérgico e serotoninérgico também estão relacionadas com o surgimento da ansiedade na DP (BRAAK et al., 1994; TESSITORE et al., 2002).

A administração de NaDMDC por 4 dias consecutivos (protocolo 3), foi capaz de provocar um déficit motor significativo nos animais. A avaliação no ENS demonstrou que, diferentemente do que ocorreu com 2 administrações, o prejuízo no estado neurológico geral dos animais permaneceu significativo até o sexto dia após a última administração. Além disso, houve uma redução na locomoção avaliada no campo aberto. Esta alteração é comumente observada em modelos animais da DP, sendo relacionada com a redução da transmissão dopaminérgica na via nigroestriatal (DUTY; JENNER, 2011; BLESA; PRZEDBORSKI, 2014).

O protocolo 3 de administração de NaDMDC também reduziu o tempo de latência para a queda dos animais no teste do rotarod. Déficits no teste do rotarod são normalmente atribuídos a prejuízos na coordenação motora e alterações cerebelares, no entanto, outros fatores como resistência cardiopulmonar, aprendizagem e déficits motores gerais podem levar a um prejuízo neste tipo de avaliação (DUTY; JENNER, 2011). Assim como a redução da locomoção no campo aberto, a piora no desempenho no teste do rotarod é frequentemente relatada em diversos modelos animais da DP (DUTY; JENNER, 2011; BLESA; PRZEDBORSKI, 2014). O efeito da administração i.n. de NaDMDC neste parâmetro reforça a susceptibilidade das funções motoras de camundongos a este ditiocarbamato.

A importância da via i.n. na toxicidade do NaDMDC foi investigada através da comparação com a administração sistêmica deste composto. Com o objetivo de observar os efeitos

sistêmicos da dose de NaDMDC utilizada por via nasal, realizamos a administração de 50 mg/kg por via i.p., uma dose equivalente ou superior àquela administrada pela via i.n. Os animais que receberam o NaDMDC por via i.p. não apresentaram nenhuma alteração comportamental nos parâmetros avaliados. O trabalho de Chou e colaboradores (2008) utilizou esta mesma dose de NaDMDC em camundongos C57/BL6, por via s.c., através de bombas de infusão contínua (50 mg/kg/dia), durante 2 semanas. Neste estudo, os autores descreveram um déficit motor no parâmetro de rotação do *pole test*, o qual envolve força e coordenação motora, usado para a avaliação de bradicinesia. O tempo mais prolongado de administração do NaDMDC e o uso de linhagens diferentes de camundongos podem ser responsáveis, ao menos em parte, por estes resultados discrepantes. A falta de toxicidade do NaDMDC administrado por via sistêmica em nosso trabalho pode ser explicada pela dificuldade deste composto em atravessar a BHE, e pela possibilidade de sofrer metabolizações na periferia, o que podem reduzir a quantidade da toxina que de fato atinge o SNC.

No sétimo dia após a última administração de NaDMDC (protocolo 3), houve um aumento no imunoconteúdo da enzima TH no estriado. Esta enzima realiza a etapa limitante na síntese de dopamina, sendo responsável pela reação de hidroxilação da L-tirosina em L-DOPA. A enzima TH pertence a uma família de hidroxilases que contém ferro, essa enzima é dependente de biotina, utilizando a tetrahidrobiopterina e O₂ para hidroxilar a L-tirosina. Para a modulação da produção de dopamina, a atividade da TH pode ser modulada através da fosforilação de diferentes resíduos de serina (Ser8, Ser19, Ser31 e Ser40) (DI GIOVANNI; PESSIA ; DI MAIO, 2012). Esta enzima é considerada um marcador de neurônios dopaminérgicos e modelos animais da DP induzidos por toxinas geralmente promovem uma redução da imunomarcagem de TH. No entanto, alguns estudos têm demonstrado que toxinas que produzem danos em neurônios dopaminérgicos podem induzir um aumento no imunoconteúdo de TH, possivelmente por um mecanismo de compensação (BEZARD et al., 2000; MORETTI et al., 2015; CUNHA et al., 2016).

Um mecanismo compensatório com aumento na expressão de TH já havia sido proposto por Zigmond e Stricker (1989). Este mesmo grupo já havia demonstrado que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de 6-OHDA em ratos provoca o

aumento na atividade desta enzima no estriado (ZIGMOND et al., 1984). Neste sentido, Blanchard e colaboradores (1995) demonstraram que a administração de 6-OHDA leva a um aumento na expressão de RNAm de TH na SNpc, 6 meses após a lesão.

No estudo de Itano e colaboradores (1995), demonstrou-se que a administração de MPP⁺, provocou um aumento transitório nos níveis de RNA mensageiro (RNAm) de TH (de 6 h a 2 dias), em células PC12, o que foi seguido por um decréscimo (4 a 7 dias) e posterior morte celular. Estes resultados sugerem um efeito bifásico desta toxina na indução do RNAm de TH (ITANO; KITAMURA; NOMURA, 1995). Ainda, Bezard e colaboradores (2000) demonstraram que a administração de MPTP (4 mg/kg/dia) em camundongos OF1, induziu uma redução do número de células positivas para TH no estriado, mas o imunocontéudo desta proteína não foi alterado, indicando o aumento da expressão de TH, com a finalidade de compensar a redução na produção de dopamina pelos neurônios perdidos.

Moretti e colaboradores (2015) demonstraram que a administração de MPP⁺, i.c.v., 1,8 µg/animal, levou ao aumento do imunocontéudo de TH, o qual foi prevenido pelo pré-tratamento com agmatina, uma molécula com propriedades neuroprotetoras (MORETTI et al., 2015). De forma semelhante, Cunha e colaboradores (2016), utilizando camundongos C57BL6, demonstraram um aumento no imunocontéudo de TH no estriado dos animais que receberam MPP⁺ em duas diferentes doses (1.8 e 18 µg/animal), via i.c.v. Estes animais apresentaram déficits motores (na maior dose) e não motores (na menor dose) (CUNHA et al., 2016).

O mecanismo comum entre as toxinas que induzem o aumento da TH (expressão de RNAm ou imunocontéudo) é o aumento do estresse oxidativo. EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) podem levar a oxidação do ferro ligado a TH, convertendo o Fe²⁺ em Fe³⁺, impedindo a ação da enzima. Além disso, a geração de peroxinitrito (ONOO⁻) durante o processo de estresse oxidativo também pode levar a inibição da TH. Esta inibição da atividade da TH pode estar ligada a produção de mecanismos compensatórios (DI GIOVANNI; PESSIA; DI MAIO, 2012). Desta forma, nosso resultado indicando que administração i.n. de NaDMDC provoca aumento do imunocontéudo da enzima TH, poderia estar relacionado com a atividade pró oxidante desta

molécula. A avaliação do imunoconteúdo de TH em diferentes períodos após a administração de NaDMDC é necessária para a melhor compreensão deste fenômeno.

Para avaliar a possível presença de neuroinflamação na toxicidade exercida pelo NaDMDC, realizou-se a dosagem dos níveis de TNF- α no BO e no estriado dos animais após o término das avaliações comportamentais (dia 7). No entanto, não foram encontradas alterações significativas nos níveis dessa citocina no período e nas estruturas avaliadas. O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória envolvida na resposta imune inata. No SNC esta citocina atua na manutenção da homeostase e em mecanismos fisiopatológicos. Em condições patológicas, os astrócitos e, principalmente, a microglia podem liberar grandes quantidades de TNF- α , que é considerado um componente chave da resposta neuroinflamatória (OLMOS; LLADO, 2014). Estudos demonstraram que os níveis de TNF- α estão aumentados em doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer, e que esta citocina está envolvida nos mecanismos patológicos dessas doenças (FRANKOLA et al., 2011). Modelos animais da DP induzidos por toxinas, como MPTP, 6-OHDA, rotenona e paraquat, têm relatado a presença de uma resposta neuroinflamatória geralmente inicial, que parece estar ligada ao estresse celular induzido pelas toxinas, e não por ativação direta de vias inflamatórias (CEBRIAN; LOIKE; SULZER, 2015). Neste sentido, os níveis inalterados de TNF- α , 7 dias após o término da administração de NaDMDC, podem ser devido à falta de estresse celular suficiente para evocar uma resposta inflamatória, ou podem ter sido normalizados devido ao tempo decorrido da administração. Para esclarecer o envolvimento da neuroinflamação nos prejuízos comportamentais induzidos pela administração i.n. é necessário a avaliação dos níveis de TNF- α , bem como de outros marcadores inflamatórios como interleucinas, óxido nítrico, astrogliose e microgliose em intervalos mais curtos após a administração i.n. do NaDMDC.

Como descrito anteriormente, o tratamento paliativo dos sintomas motores observados na DP é realizado através da utilização de fármacos que aumentam a neurotransmissão dopaminérgica nos núcleos da base. Os resultados do presente estudo indicam que a administração de L-DOPA provocou uma recuperação no déficit locomotor induzido pela administração i.n. de NaDMDC, caracterizado pela avaliação da distância total

percorrida no teste do campo aberto. A atividade antiparkinsoniana da L-DOPA foi descrita ainda na década de 1960 e até os dias atuais ela continua sendo o fármaco de primeira escolha para o tratamento das alterações motoras da DP (CARLSSON, 1959b; HORNYKIEWICZ, 2010).

A atenuação do prejuízo locomotor induzido pelo NaDMDC após o tratamento com a L-DOPA reforça a hipótese de que este ditiocarbamato cause uma disfunção dopaminérgica em animais, relacionadas àquelas observadas em pacientes com a DP. Além disso, diversos estudos em modelos animais têm demonstrado que o tratamento com a L-DOPA melhora os déficits motores evocados pela perda de neurônios dopaminérgicos (para revisão ver: DUTY; JENNER, 2011).

Neste sentido, a administração de apomorfina, além de reverter os déficits locomotores, como a L-DOPA, também reverteu os prejuízos apresentados no teste do rotarod. A apomorfina é um agonista dos receptores dopaminérgicos, com maior afinidade para os receptores D₂, em relação aos receptores D₁ (SCHWAB; AMADOR; LETTVIN, 1951; BRUNTON; LAZO; PARKER, 2005). Este fármaco é comumente utilizado em modelos animais da DP, com o objetivo de reverter déficits motores (DUTY; JENNER, 2011). Neste sentido, o estudo de Lulla e colaboradores (2016), demonstrou que administração de apomorfina atenuou o déficit motor induzido pelo ziram em embriões de Zebrafish.

No presente estudo, as administrações de L-DOPA e de apomorfina em animais que haviam recebido previamente veículo por via i.n. reduziram a locomoção dos animais no teste do campo aberto. Esta ação pode estar relacionada com uma possível atividade sedativa destas drogas, mediada por receptores dopaminérgicos (DI CHIARA et al., 1976). O estudo de Andreu e colaboradores (1999) relatou o aparecimento de sedação em indivíduos saudáveis que fizeram uso de L-DOPA + benserazida. Este estudo demonstrou que a sedação induzida pela L-DOPA em indivíduos saudáveis sofre tolerância, e que quando estes indivíduos são tratados por períodos mais prolongados (11 dias) o efeito sedativo tende a desaparecer. Da mesma forma, estudos prévios têm demonstrado que a apomorfina pode provocar hipolocomoção e sedação em animais nas mesmas doses capazes de reverter déficits locomotores em modelos animais da DP (ANDREU et al., 1999). O mecanismo responsável pela indução da sedação, a qual acredita-se ser a responsável pela

hipolocomoção dos animais, ainda não está totalmente compreendido, mas pode estar relacionado com a ativação de receptores dopaminérgicos em neurônios hipotalâmicos, uma estrutura crucial no controle do sono vigília. Além disso, podem ocorrer interações entre o sistema dopaminérgico e os sistemas histaminérgico e noradrenérgico (ANDREU et al., 1999).

A disfunção na neurotransmissão dopaminérgica induzida pela administração i.n. de NaDMDC pode ser originada por um dano oxidativo inicial, produzido pelo ditiocarbamato. Nosso estudo demonstrou pela primeira vez que a administração i.n. de NaDMDC provocou um aumento nas EROs no BO e estriado, 2 horas após a última administração. O fenômeno de estresse oxidativo é ocasionado pelo desequilíbrio do estado redox da célula, devido ao aumento da geração de EROs e/ou diminuição do sistema antioxidante, e está relacionado com a fisiopatologia de diversas doenças, incluindo a DP (KIM et al., 2015). Com relação a fisiopatologia da DP, fatores ambientais como neurotoxinas, pesticidas, mutações genéticas e o próprio metabolismo da dopamina podem contribuir para a geração do estresse oxidativo, seja diretamente, ou através da indução de disfunção mitocondrial (BLESA et al., 2015).

Ainda, nossos resultados demonstraram que, 24 horas após o fim do tratamento com NaDMDC, os níveis de EROs permaneceram significativamente elevados no estriado, mas não no BO dos animais, indicando maior susceptibilidade desta estrutura à toxicidade exercida pelo ditiocarbamato. Essa observação vai de encontro aos estudos de Chou e colaboradores (2008) e de Lulla e colaboradores (2016), que demonstram uma toxicidade seletiva do ziram para neurônios dopaminérgicos. Além disso, a vulnerabilidade das vias dopaminérgicas ao estresse oxidativo está relacionada as propriedades pró-oxidativas da molécula de dopamina. A metabolização da dopamina pela enzima monoamina oxidase, ou sua auto-oxidação, levam a geração de EROs. Este processo oxidativo pode alterar a respiração mitocondrial e a permeabilidade da membrana mitocondrial, induzindo processos de morte celular (para revisão ver: BLESA et al., 2015).

Estudos iniciais *in vitro* com o ziram não demonstraram propriedades pró-oxidativas (CREBELLI et al., 1992; WANG et al., 2006). Porém, estudos posteriores demonstraram a capacidade do ziram em aumentar a produção de EROs e conseqüente dano

oxidativo celular (DENNIS; VALENTINE, 2015; MUROI; TANAMOTO, 2015; MATEI; TROMBETTA, 2016). Matei e Trombetta (2016) demonstraram que a exposição *in vitro* de astrócitos hipocámpais de ratos ao ziram leva a um aumento nos níveis de MDA, de proteínas do estresse (proteína do choque térmico e heme oxigenase I), de glutatona peroxidase (GPx) e de glutatona oxidada (GSSG).

No presente estudo, a administração i.n. de NaDMDC provocou um aumento na incorporação de IP em fatias do estriado, 2 horas, mas não 24 horas após a última administração. Este resultado indica o dano a membrana celular que geralmente está associado a processos de morte celular. A desestabilização da membrana plasmática pode ocorrer devido a oxidação de seus lipídios, permitindo a entrada de IP. Outras neurotoxinas como o MPTP, a 6-OHDA e a rotenona, também têm demonstrado provocar um aumento na incorporação de IP em diferentes modelos (MOLDZIO et al., 2008; PUTTONEN et al., 2008; HAJIEVA et al., 2009; SU et al., 2015).

2.7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste capítulo demonstram que a administração i.n. repetida de NaDMDC, durante 4 dias, pode induzir déficits motores e comprometimento neurológico em camundongos, os quais podem estar associados com alterações na neurotransmissão dopaminérgica. Estas alterações podem estar relacionadas com danos neuronais induzidos pelo aumento da produção de EROs. Desta forma, reforçamos a relação da toxicidade dos produtos à base de DMDC, como o NaDMDC, ziram e tiram, amplamente utilizados na indústria e agricultura, com a etiopatologia da DP. Ainda, evidenciamos o importante papel da vetorização olfatória nos danos provocados por toxinas ambientais ao SNC.

3 CAPÍTULO 3: EFEITOS DO TRATAMENTO COM MELATONINA SOBRE AS ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICAS INDUZIDAS PELA ADMINISTRAÇÃO INTRANASAL DE NADMD

3.1 INTRODUÇÃO

3.1.1 Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é uma indolamina, sintetizada por diferentes tecidos, principalmente pela glândula pineal, em mamíferos. Esta molécula tem sido considerada o hormônio da escuridão, pois a sua produção pela glândula pineal apresenta um ciclo circadiano, com baixa produção durante o dia e altas produções durante a noite (REITER; TAN; GALANO, 2014; ERREN; REITER, 2015).

A melatonina foi isolada em 1958 pelo dermatologista Aaron B. Lerner a partir do pó liofilizado de glândula pineal bovina (LERNER et al., 1958). Seu nome originou-se da sua capacidade de promover a descoloração da pele de girinos, sapos e peixes. Posteriormente, em 1963, Wurtman e colaboradores demonstraram que a melatonina é amplamente distribuída em diferentes órgãos de ratos e gatos, sendo encontrada em ovários, olhos e outros órgãos periféricos, inervados pelo sistema nervoso autônomo (WURTMAN; AXELROD; CHU, 1963).

A variação nos níveis de melatonina durante o ciclo circadiano foi demonstrada por Axelrod e colaboradores (1965). Neste mesmo estudo, foi proposta uma via neural ligando a retina com a glândula pineal, com a participação de fibras pós-ganglionares simpáticas, originadas do gânglio cervical superior (AXELROD; WURTMAN; SNYDER, 1965).

Atualmente, sabe-se que além da glândula pineal, células de diferentes tecidos podem produzir melatonina em mamíferos, como células da retina (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2014), macrófagos (MARTINS et al., 2004), mastócitos, linfócitos (CARRILLO-VICO et al., 2013), células da medula óssea (CONTI et al., 2000), astrócitos (STEFULJ et al., 2001), células tipo-enterocromafins (BUBENIK, 2008), oócitos (SAKAGUCHI et al., 2013), trofoblastos placentários (LANOIX et al., 2008) e fagócitos

do colostro (PONTES et al., 2007). A sua síntese é realizada pela acetilação da serotonina, e posterior metilação da N-acetilserotonina (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003). As enzimas aril-alquil-N-acetiltransferase (AANAT) e acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT), também conhecida como hidroxil-indol-O-metiltransferase (HIOMT), que participam da síntese da melatonina, são altamente conservadas, sendo detectadas em organismos unicelulares, plantas e animais (CAZAMEA-CATALAN et al., 2014; PARK et al., 2014; SCHIPPERS; NICHOLS, 2014).

A conversão de serotonina a N-acetilserotonina pela AANAT é a etapa chave para a regulação da produção de melatonina pelos pinealócitos e o consequente ritmo circadiano deste neurohormônio. Devido ao fato de que a melatonina é produzida principalmente à noite, em animais diurnos e noturnos, a regulação da produção de melatonina é feita de maneira diferente, de acordo com esta classificação. Em animais diurnos, somente a atividade da enzima AANAT está sob controle da luz, enquanto em animais noturnos a transcrição e tradução da AANAT são induzidas pela escuridão (SIMONNEAUX ; RIBELAYGA, 2003; TERRIFF et al., 2005). Considerando o início da escuridão, o surgimento da melatonina no plasma ocorre mais rápido em animais diurnos, em comparação a animais noturnos. Neste sentido, estudos demonstraram que em humanos é possível detectar melatonina 1 hora após o início da escuridão, enquanto são necessárias ao menos 3 horas para ocorrência do mesmo fenômeno em roedores de hábitos noturnos (FERNANDES et al., 2009; DE OLIVEIRA TATSCH-DIAS et al., 2013).

A pineal é uma glândula endócrina de origem epitelial, assim como o SNC, formada por pinealócitos (neurônios modificados), astrócitos e microglia (SIMONNEAUX ; RIBELAYGA, 2003). Fibras nervosas simpáticas, originadas no gânglio cervical superior, e não-simpáticas, originadas nos gânglios esfenopalatino e óptico, inervam essa glândula. A ativação simpática pelo estímulo da escuridão é chave para a indução da produção de melatonina pela glândula pineal (SCHOMERUS; KORF, 1999; MOLLER; BAERES, 2002).

A escuridão é transmitida ao núcleo supraquiasmático hipotalâmico pelo trato retinohipotalâmico, ativando uma via polissináptica, a qual leva a liberação de noradrenalina e ATP pelos terminais nervosos simpáticos que chegam até a glândula pineal. O estímulo de receptores β -adrenérgicos na glândula

pineal, por sua vez, leva ao aumento de AMP cíclico, o qual leva a ativação do fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB, do Inglês: *cAMP responsive element-binding*) e da PKA, os quais induzem a transcrição do gene *Aanat* e a fosforilação da enzima AANAT (Fig. 26). A enzima AANAT possui uma vida útil muito curta, sendo ubiquitinada e degradada pelo sistema proteossoma logo após ser sintetizada, o que mantém níveis baixos de melatonina durante o dia, mesmo com a síntese constitutiva da enzima (SIMONNEAUX; RIBELAYGA, 2003; TERRIFF et al., 2005).

O papel da inervação parassimpática da glândula pineal ainda não está totalmente esclarecido. Em ratos, os receptores muscarínicos na glândula pineal estão presentes somente na fase do desenvolvimento (SCHOMERUS; KORF, 1999). Em ratos adultos, somente receptores nicotínicos de acetilcolina estão presentes, levando à entrada de íons cálcio e a liberação de glutamato. O glutamato, por sua vez inibe a síntese de melatonina induzida pela noradrenalina (VILLELA et al., 2013). Mais recentemente, a participação da transmissão GABAérgica na síntese de melatonina tem sido descrita. Além disso, a glândula pineal é capaz de se comunicar com o encéfalo e com a periferia através de substâncias liberadas no LCR e na circulação sanguínea, tais como citocinas inflamatórias e hormônios (MOLLER; BAERES, 2002; YU et al., 2016).

A produção da melatonina pela glândula pineal também pode ser regulada pelo comprimento do fotoperíodo. A enzima ASMT pode ser a responsável por esta regulação. Em hamsters siberianos, a atividade da ASMT parece ser duas vezes maior durante fotoperíodos curtos em comparação a fotoperíodos longos, e o pico de liberação de melatonina parece seguir o mesmo perfil. A ASMT é o passo limitante da síntese de melatonina. Portanto, enquanto a regulação da enzima AANAT é a responsável pelo ciclo circadiano da melatonina, a enzima ASMT parece ser responsável pela variação da amplitude da produção de melatonina provocada pela diferença do fotoperíodo ao longo das estações do ano (RIBELAYGA; PEVET; SIMONNEAUX, 2000; LIU; BORJIGIN, 2005).

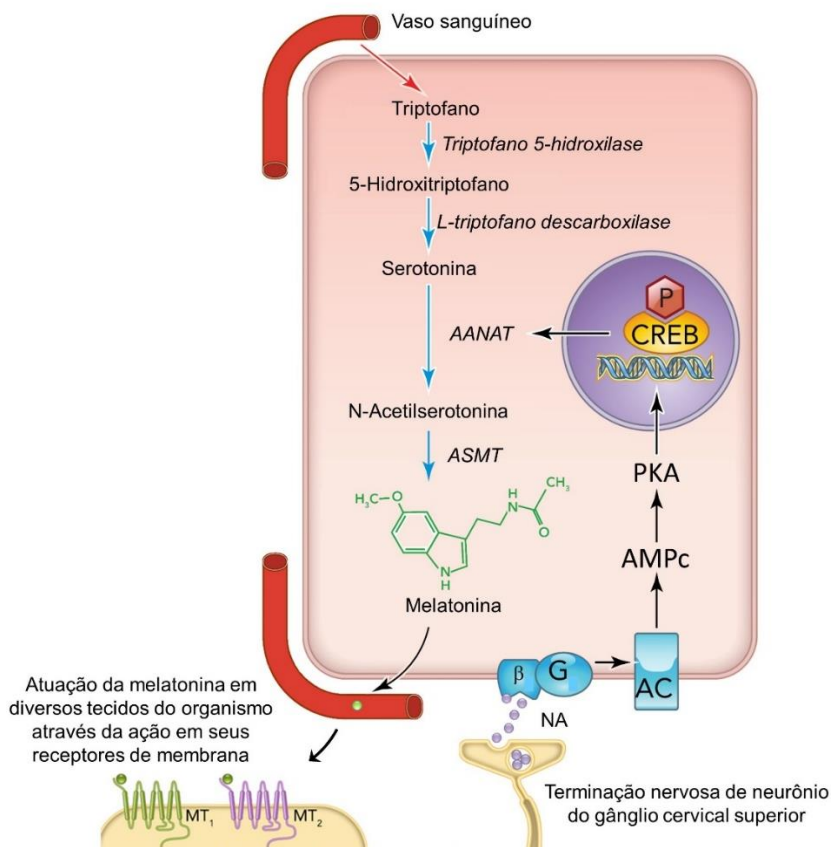
Os efeitos da melatonina nos diversos tecidos do organismo são mediados pela ligação a GPCRs de alta afinidade, MT1 e MT2, por receptores nucleares e por sua habilidade de doar elétrons, atuando como uma molécula antioxidante (JOCKERS et al., 2016).

Apesar da capacidade antioxidante intrínseca da molécula de melatonina, os efeitos antioxidantes também podem ser mediados pela ativação dos receptores MT1/MT2 e consequente indução da expressão e atividade de enzimas envolvidas na remoção de EROs e ERNs, uma ação que requer quantidades pequenas do hormônio (CARRILLO-VICO et al., 2013).

Os receptores de melatonina também podem formar homodímeros e heterodímeros, o que torna a farmacologia deste hormônio mais complexa. Os receptores MT2 podem dimerizar com receptores 5HT_C de serotonina em células renais embrionárias e células corticais (KAMAL et al., 2015). Os receptores de melatonina também podem formar dímeros com os GPCR50, os quais têm certa similaridade com os receptores de melatonina, mas não se ligam diretamente ao neurohormônio. A formação do complexo MT1/GPCR50 inibe a função do receptor MT1, mas o mesmo não acontece com o receptor MT2, quando da formação do dímero MT2/GPCR50 (LEVOYE et al., 2006; DUFOURNY et al., 2008).

Devido a diversidade de mecanismos de ação exercidos pela melatonina em mamíferos, diferentes ações desta molécula já foram descritas, como antinociceptiva, antidepressiva, antitumoral e neuroprotetora (para revisão ver: ANDERSEN et al., 2016). A atividade neuroprotetora será descrita em mais detalhes na próxima seção.

Figura 26 – Representação simplificada da síntese de melatonina em pinealócitos.



Legenda: A melatonina é sintetizada a partir do triptofano presente na circulação sanguínea, o qual é convertido a 5-hidroxitriptofano e, posteriormente, em serotonina, pela ação das enzimas triptofano 5-hidroxilase e L-triptofano descarboxilase, respectivamente. A serotonina é convertida em N-acetilserotonina pela enzima aril-alquil-N-acetiltransferase (AANAT). A expressão e a atividade desta enzima são reguladas pela inervação noradrenérgica advinda principalmente do gânglio cervical superior, em resposta a alterações no fotoperíodo captadas pela retina e transmitidas pelo trato retino-hipotalâmico.

Continuação da legenda da Figura 26: A ativação dos receptores β -adrenérgicos provoca o aumento de AMP cíclico, o qual leva a ativação da proteína quinase A (PKA) e do fator de transcrição proteína de ligação ao elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), induzindo a transcrição do gene *Aanat*. A N-acetilserotonina é convertida em melatonina pela enzima acetilserotonina-O-metiltransferase (ASMT) e posteriormente difundida para os tecidos centrais e periféricos através da circulação sanguínea, gerando efeitos biológicos, em parte mediados pelos receptores de membrana MT1 e MT2. NA, noradrenalina.

Fonte: Adaptado de Reiter et al. (2014).

3.1.2 Atividade neuroprotetora da melatonina

Mecanismos de neuroproteção preservam a estrutura e a função neuronal contra danos agudos ou crônicos ao SNC. Alterações abruptas na irrigação sanguínea por trauma ou isquemia, ou a presença de neurotoxinas, demandam reações imediatas das células do sistema nervoso. Efeitos deletérios iniciados por moléculas endógenas ou processos disfuncionais, são as bases das doenças neurodegenerativas e dos tumores cerebrais. Além disso, alterações inflamatórias, formação de EROs e ERNs, disfunção mitocondrial, excitotoxicidade, apoptose e agregação de proteínas são processos comumente encontrados nesses casos e relacionados a danos neuronais (JEONG; PARK, 2015; LIU et al., 2017).

O efeito neuroprotetor da melatonina já foi demonstrado em nível molecular, celular e tecidual, em modelos animais e ensaios clínicos, relacionados a diversas doenças que atingem o SNC. Neste sentido, a redução de mediadores inflamatórios, da apoptose e do desbalanço do estado redox estão envolvidos nos mecanismos da atividade neuroprotetora da melatonina (LAHIRI, 1999; SCHAPIRA; OLANOW, 2004; DRAGICEVIC et al., 2011).

Vários estudos demonstraram a atividade antioxidante da melatonina, seja diretamente neutralizando espécies reativas, ou através das ações medidas pelos receptores. A melatonina e os metabólitos N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) e N1-acetil-N2-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) são doadores de elétrons e neutralizam radicais hidroxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio *singlet* de uma maneira estequiométrica. A ativação de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 exercem efeito neuroprotetor, principalmente pelo controle da expressão de enzimas antioxidantes, como: glutatona peroxidase, glutatona redutase e

superóxido dismutase (CHOI et al., 2011; O'NEAL-MOFFITT et al., 2015; REITER et al., 2016).

Disfunções no sistema melatoninérgico em diversas doenças neurodegenerativas reforçam o envolvimento do sistema melatoninérgicos nestas patologias. Neste sentido, indivíduos com a doença de Huntington apresentam um atraso na produção noturna de melatonina (AZIZ et al., 2009). As recaídas clínicas apresentadas por pacientes com esclerose múltipla são correlacionadas negativamente com os níveis de melatonina (FAREZ et al., 2015). Ainda, o pico noturno de produção de melatonina parece desaparecer em pacientes com a doença de Alzheimer e acidente vascular cerebral (UCHIDA et al., 1996; ZHOU et al., 2003; RITZENTHALER et al., 2009).

A DP é uma exceção com relação aos níveis de melatonina, pois os dados disponíveis na literatura são bastante controversos. Os resultados da literatura variam entre sem alteração, pequena mudança de fase, ou redução na produção de melatonina (FERTL et al., 1991; 1993; BORDET et al., 2003; VIDENOVIC et al., 2014). Videnovic e colaboradores (2014) demonstraram uma redução nos níveis circadianos de melatonina em pacientes com a DP, no entanto essa redução era ainda maior em pacientes com sonolência diurna excessiva, um distúrbio do sono. Além disso, trabalhadores noturnos apresentam risco diminuído de desenvolver DP, enquanto que sono prolongado durante o dia foi relacionado com aumento no risco de desenvolver DP (CHEN et al., 2006; GAO et al., 2011).

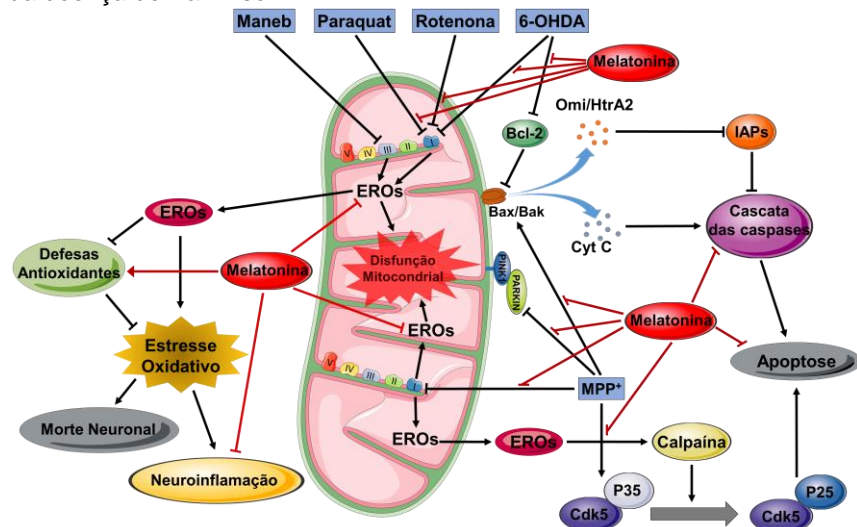
Além da alteração nos níveis de produção de melatonina, em algumas doenças neurodegenerativas são também observadas alterações na expressão de receptores melatoninérgicos. Em pacientes com a DP, a expressão de MT1 e MT2 está reduzida na amígdala e SNpc (ADI et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que pacientes com a doença de Alzheimer apresentam uma expressão reduzida de MT1 e MT2 no córtex e na glândula pineal, redução de MT1 no núcleo supraquiasmático e uma modulação no hipocampo, caracterizada pelo aumento de MT1 e diminuição de MT2 (SAVASKAN et al., 2005; BRUNNER et al., 2006; WU et al., 2007). Além disso, a proteína β -amiloide pode se ligar aos receptores melatoninérgicos, impedindo a ação da melatonina por estas vias na célula (CECON et al., 2015).

3.1.3 Evidências experimentais da atividade neuroprotetora da melatonina na doença de Parkinson

As alterações na produção de melatonina e expressão dos seus receptores na DP, assim como o potencial antioxidante atribuído a esta molécula, levaram ao interesse pelo possível papel neuroprotetor da melatonina na DP. Neste sentido, sabe-se que o SNC é altamente vulnerável aos efeitos de EROs, principalmente devido ao alto consumo de oxigênio neste tecido (KIM et al., 2015).

Diversas toxinas têm sido usadas para mimetizar as características neuroquímicas e comportamentais da DP em animais, com o intuito de aumentar o conhecimento sobre a patogênese e os mecanismos moleculares desta doença. Os modelos baseados na administração de neurotoxinas também são úteis para o teste de novos tratamentos, incluindo novos agentes com potencial neuroprotetor (JACKSON-LEWIS; BLESA; PRZEDBORSKI, 2012). Neste contexto, a administração de melatonina exógena tem apresentado um efeito neuroprotetor promissor em modelos animais da DP, induzidos por diferentes toxinas, como: 6-OHDA, MPTP, rotenona, paraquat e maneb (JIN et al., 1998; KIM et al., 1998; SINGHAL et al., 2011; BASSANI et al., 2014). O Quadro 2 sumariza alguns estudos que avaliaram o efeito da melatonina em modelos experimentais da DP. A Figura 27 resume os principais mecanismos de toxicidade das neurotoxinas utilizadas para modelar a DP experimentalmente e as principais ações da melatonina que justificam sua atividade neuroprotetora.

Figura 27 - Sumário dos mecanismos moleculares associados ao efeito neuroprotetor da melatonina em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* da doença de Parkinson.



Legenda: O principal mecanismo molecular das neurotoxinas utilizadas para modelar a doença de Parkinson está relacionado com a capacidade destas toxinas de inibir a atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial. A inibição destes complexos leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, a disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, ativação de vias apoptóticas, culminando na morte neuronal. A melatonina exerce seu efeito neuroprotetor através de diferentes mecanismos: proteção da atividade do complexo I mitocondrial, neutralização das EROs, aumento das defesas antioxidantes celulares, redução da neuroinflamação, inibição da cascata das caspases e da apoptose celular. A melatonina também é capaz de proteger contra a indução da expressão de Bax e de Cdk5/p35, e contra a inibição da expressão de Bcl-2 e Parkin/PINK1, induzidas por toxinas em modelos da Doença de Parkinson. 6-OHDA, 6-hidroxidopamina; Bcl2, célula B de linfoma 2; Bak, Bcl2 antagonista/killer; Bax, proteína X associada a Bcl2; Cdk5, cinase dependente de ciclina 5; Cyt C, citocromo C; IAPs, proteínas inibidoras de apoptose; MPP⁺, 1-metil-4-fenilpiridina; Omi/HtrA2, HtrA serina peptidase 2.

Fonte: Mack et al. (2016).

Quadro 2 – Sumário de estudos demonstrando o efeito neuroprotetor da melatonina em modelos experimentais da doença de Parkinson.

Toxina	Animais	Abordagem Experimental	Principais Achados	Referência
6-OHDA	Ratos Wistar machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (8 µg) na SNpc direita. Tratamento com melatonina (1 e 10 mg/kg, i.p.) antes da administração de apomorfina.	O tratamento com melatonina inibiu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina.	BURTON; DAYA; POTGIETER (1991)
	Células PC12	Pré-incubação (3 h) com melatonina (10^{-7} e 10^{-9} M). Incubação com 6-OHDA (25, 50, 100 e 250 µM).	A melatonina preveniu a redução da viabilidade celular e a apoptose induzida pela 6-OHDA. O tratamento com melatonina também preveniu a redução de RNAm de enzimas antioxidantes, induzida pela 6-OHDA.	MAYO et al. (1998)
	Ratos Sprague-Dawley machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (20 µg/5 µL) no estriado direito. A melatonina (3 e 10 mg/kg, i.p.) foi administrada 1 h antes, imediatamente após, 1 h e 2 h após a injeção de 6-OHDA. Posteriormente, os animais receberam administrações diárias de melatonina por 3 dias.	O tratamento com melatonina reverteu as alterações induzidas pela 6-OHDA nos níveis estriatais de MDA e DA, e na atividade da TH.	JOO et al. (1998)
	Células PC12	Pré-incubação (3 h) com melatonina 10^{-7} M. Posterior incubação com 25, 50 e 100 µM de 6-OHDA.	A melatonina protegeu as células da apoptose e das lesões necróticas induzidas pela 6-OHDA.	MAYO et al. (1999)

Quadro 2 – Continuação.

6-OHDA	Ratos Sprague-Dawley machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (8 µg/2 µL) na SNpc direita. O tratamento com melatonina (50 ± 7,5 µg/h, s.c.) foi iniciado imediatamente após a injeção de 6-OHDA e foi mantida por 7 dias.	O tratamento com melatonina preveniu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina e a inibição da atividade do complexo I, induzida pela 6-OHDA.	DABBENI-SALA et al. (2001)
	Ratos Wistar machos	Injeção unilateral de 6-OHDA no estriado direito (duas injeções de 12 µg em 2 µL de salina). Pós-tratamento (1 h) com melatonina (2, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p.) diariamente, por 7 dias.	O tratamento com melatonina preveniu a depleção dos níveis de DA e serotonina no estriado, induzida pela 6-OHDA. A melatonina inibiu o comportamento rotacional induzido pela apomorfina.	AGUIAR et al. (2002)
	Células SK-N-SH	Pré-incubação (1 h) com melatonina (0,1, 0,5, 1,0 e 2,0 mM). Incubação com 6-OHDA (100 µM) por 24 h.	A melatonina protegeu as células da redução de viabilidade induzida pela 6-OHDA e aumentou a atividade da cascata de sinalização c-Jun-N cinase terminal.	CHETSAWANG; GOVITRAPONG; EBADI (2004)
	Ratos Sprague-Dawley machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (8,75 µg) no estriado. Após a lesão os animais receberam a melatonina (0,4 ou 4 µg/mL) na água de beber por 10 semanas.	O tratamento com melatonina, 4 µg/mL, reverteu os déficits motores e normalizou o imunocontéudo de TH e os níveis de RNAm de GDNF.	SHARMA et al. (2006)

Quadro 2 – Continuação.

6-OHDA	Ratos Sprague-Dawley fêmeas	Pré-tratamento com melatonina (0,5 mg/kg, i.p.) por 7 dias. No dia 8 os animais receberam uma injeção unilateral de 6-OHDA (8 µg) no estriado lateral.	O tratamento com melatonina preveniu os déficits motores (observados nas rotações induzidas pela apomorfina, teste da escadaria, tempo para se libertar, teste da pisada, e equilíbrio postural) induzidos pela 6-OHDA.	SINGH et al. (2006)
	Ratos Wistar machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (8 µg) no feixe prosencefálico medial direito. O tratamento com melatonina (10 mg/kg, v.o.) foi iniciado 4 dias após a injeção de 6-OHDA e continuou durante 30 dias.	O tratamento com melatonina melhorou a performance motora, sem provocar discinesias. A melatonina também protegeu os neurônios positivos para TH e a ultraestrutura neuronal do estriado.	GUTIERREZ-VALDEZ et al. (2012)
	Ratos Wistar machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (12 µg) no feixe prosencefálico medial direito. A melatonina (10 mg/kg/dia, i.p.) foi administrada por 23 dias antes e 7 dias após, ou somente 7 dias após a injeção de 6-OHDA.	O tratamento com melatonina reduziu a atividade da COX e caspase-3, e os níveis de PGE ₂ , além de aumentar os níveis de Bcl-2, que haviam sido alterados pela injeção de 6-OHDA. A melatonina também preveniu a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc.	YILDIRIM et al. (2014)

Quadro 2 – Continuação.

6-OHDA	Ratos Sprague-Dawley machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (20 µg/5 µL) no estriado direito. A melatonina (3 e 10 mg/kg, i.p.) foi administrada 1 h antes, imediatamente após, 1 h e 2 h após a injeção de 6-OHDA. Posteriormente, os animais receberam administrações diárias de melatonina por 3 dias.	A melatonina reduziu os déficits motores e protegeu contra a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc e estriado dorsolateral, induzida pela 6-OHDA.	KIM et al. (1998)
	Ratos Wistar machos	Injeção unilateral de 6-OHDA (12 µg) no feixe prosencefálico medial direito. A melatonina (10 mg/kg/dia, i.p.) foi administrada por 23 dias antes e 7 dias após, ou somente 7 dias após a injeção de 6-OHDA.	O tratamento com melatonina preveniu a perda de neurônios dopaminérgicos, induzida pela 6-OHDA, aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, catalase e GPx), além de reduzir a peroxidação lipídica. O pré-tratamento com melatonina foi mais efetivo em combater os déficits induzidos pela 6-OHDA.	OZSOY et al. (2015)
MPP⁺	Ratos Sprague-Dawley machos e fêmeas	Pré-tratamento (30 min) com melatonina (10 mg/kg, i.p.). Injeção unilateral de MPP ⁺ (7,4 µg) na SNpc direita. Os animais foram submetidos a um pós-tratamento agudo ou crônico.	O tratamento com melatonina reduziu a peroxidação lipídica e protegeu contra a perda de neurônios dopaminérgicos, induzida pelo MPP ⁺ .	JIN et al. (1998)

Quadro 2 – Continuação.

MPP⁺	Mitocôndrias hepáticas e sinaptossomas estriatais	Pré-incubação com melatonina (10^{-6} a 10^{-3} M). Incubação com MPP ⁺ (10^{-6} a 10^{-3} M).	A melatonina preveniu a inibição do complexo I, induzida pelo MPP ⁺ .	ABSI et al. (2000)
Ratos machos	Wistar	Injeção unilateral de MPP ⁺ (0,1 μ mol) no estriado direito. A melatonina (10 mg/kg, i.p.) foi administrada 1 h antes e 1, 3, e 5 h depois da administração de MPP ⁺ .	O tratamento com melatonina reduziu a toxicidade do MPP ⁺ a neurônios dopaminérgicos e normalizou os níveis de GSH.	CHEN et al. (2002)
	Células SH-SY5Y	Pré-incubação (4 h) com melatonina (200 μ M). Incubação (72 h) com MPP ⁺ (1 mM).	A melatonina reduziu o dano oxidativo ao DNA mitocondrial, acumulação de EROs, geração de colapso do potencial de membrana mitocondrial e morte celular.	CHEN et al. (2005)
	Células granulares do cerebelo	Co-incubação com MPP ⁺ (200 μ M) e melatonina (1 mM).	A melatonina protegeu a viabilidade celular e preveniu a apoptose. O tratamento com melatonina também reduziu a expressão de cdk5 e a clivagem de cdk5-35 a cdk5-25 induzida pelo MPP ⁺ .	ALVIRA et al. (2006)
	Células SK-N-SH	Pré-incubação (1 h) com melatonina (1 mM). Incubação com MPP ⁺ (0,1 mM).	A melatonina preveniu a fosforilação de c-Jun, a ativação de caspase-3, fator de fragmentação do DNA 45 e fragmentação do DNA, induzida pelo MPP ⁺ .	CHETSAWANG; GOVITRAPONG; CHETSAWANG (2007)

Quadro 2 – Continuação.

MPP⁺	Ratos Wistar	Injeção de 1 µL de 50 mM MPP ⁺ no estriado direito. A melatonina (10 mg/mL, i.p.) foi administrada 0, 1, 2, 3, 4, 24, 48, e 72 h após a injeção de MPP ⁺ .	A melatonina protegeu os neurônios dopaminérgicos da apoptose induzida pelo MPP ⁺ . A melatonina recuperou os níveis de RNAm e a expressão proteica do fator de crescimento de fibroblastos 9, que estavam reduzidos pela administração de MPP ⁺ .	HUANG; HONG; CHUANG (2009)
MPTP	Camundongos C57Bl/6	Injeção de MPTP (20 mg/kg, s.c.). A melatonina (10 mg/kg i.p.) foi administrada 30 min antes e a cada hora (for 3 h) após a injeção de MPTP.	O tratamento com melatonina preveniu a peroxidação lipídica induzida pela administração de MPTP, e a perda de neurônios positivos para TH no estriado.	ACUNA-CASTROVIEJO et al. (1997)
	Camundongos C57Bl/6 machos	Quatro administrações de MPTP (15 mg/kg, s.c.) com intervalos de 2 h. Após 24 h os animais receberam 3 administrações adicionais com a mesma dose e intervalos. A melatonina (20 mg/kg s.c.) foi administrada 1 h antes da primeira injeção de MPTP.	O tratamento com melatonina preveniu a indução da iNOS mitocondrial no estriado e SNpc. A melatonina também protegeu a atividade do complexo I e inibiu a peroxidação lipídica.	TAPIAS et al. (2009)

Quadro 2 – Continuação.

MPTP	Camundongos C57Bl/6 machos	Quatro administrações de MPTP (15 mg/kg, s.c.) com intervalos de 2 h. Após 24 h os animais receberam 3 administrações adicionais com a mesma dose e intervalos. A melatonina (20 mg/kg s.c.) foi administrada 1 h antes da primeira injeção de MPTP.	O tratamento com melatonina preveniu a indução da iNOS mitocondrial no estriado e SNpc. A melatonina também protegeu a atividade do complexo I e inibiu a peroxidação lipídica.	TAPIAS et al. (2009)
	Células de astrocitoma de rato	Pré-incubação com melatonina (50, 100 e 200 µM). Incubação com MPTP (400 µM).	A melatonina reduziu o estresse oxidativo e nitrosativo, cálcio intracelular, e ativação de P-p38 MAPK, induzidos pelo MPTP. A melatonina também normalizou os níveis de proteínas inflamatórias, RNAm de citocinas pró-inflamatórias e NF-κB.	NIRANJAN; NATH; SHUKLA (2010)
	Camundongos C57BL/6 machos	Dez injeções de MPTP (15 mg/kg, i.p.) durante 5 semanas (2 injeções/semana). A melatonina (5 mg/kg, i.p.) foi administrada uma semana antes, 5 semanas durante, e 12 semanas após o tratamento com MPTP.	O tratamento com melatonina recuperou a respiração mitocondrial, a produção de ATP e os níveis de enzimas antioxidantes. A melatonina também foi capaz de prevenir a perda de neurônios dopaminérgicos e os déficits locomotores.	PATKI; LAU (2011)

Quadro 2 – Continuação.

MPTP	Camundongos Swiss machos	Quatro injeções de MPTP (20 mg/kg, i.p.) com 2 h de intervalo. Oito dias após a administração de MPTP, os animais receberam L-DOPA/Carbidopa (100/10 mg/kg duas vezes por dia, v.o.) e/ou melatonina (5 ou 10 mg/kg/dia, v.o.) durante 8 semanas.	O tratamento com melatonina recuperou a performance motora, os níveis estriatais de DA e GSH, a atividade das enzimas antioxidantes, e reduziu a peroxidação lipídica. A melatonina também melhorou a resposta motora a L-DOPA.	ZAITONE; HAMMAD; FARAG (2013)
	Camundongos BALB/c machos	O MPTP (30 mg/kg, i.p.) foi administrado em duas injeções (16 h de intervalo). A melatonina (10, 20, and 30 mg/kg, i.p.) foi administrada 30 min antes da administração de MPTP, e mais 5 administrações com 10 h de intervalo.	O tratamento com melatonina protegeu contra a perda de neurônios dopaminérgicos na SNpc, induzida pelo MPTP, e reforçou os efeitos do tratamento com L-DOPA.	NASKAR et al. (2015)
	Embriões de Zebrafish	Incubação com MPTP (600 µM). Incubação com melatonina (0,2 e 1,0 µM), concomitantemente, ou após o tratamento com MPTP.	A melatonina recuperou os déficits motores induzidos pelo MPTP e restaurou a expressão e função do <i>loop parkin/PINK1/DJ-1/MUL1</i> .	DIAZ-CASADO et al. (2016)
Rotenona	<i>Drosophila melanogaster</i>	A melatonina (5 mM) e/ou a rotenona (125 µM) foram adicionadas ao meio de alimentação por 7 dias.	O tratamento com melatonina preveniu os déficits motores e a perda neuronal, induzidos pela rotenona.	COULOM; BIRMAN (2004)

Quadro 2 – Continuação.

Rotenona	Ratos Sprague-Dawley machos	Injeção de rotenona (6 µg em 1 µL) na SN direita. A melatonina (10, 20 e 30 mg/kg, i.p.) foi administrada 30 min após a injeção de rotenona e, posteriormente, a cada 12 h por 4 dias.	A melatonina reduziu os níveis de radicais hidroxil em mitocôndrias isoladas, protegeu os níveis de GSH e a atividade de enzimas antioxidantes no estriado.	SARAVANAN; SINDHU; MOHANAKUMAR (2007)
	Ratos Wistar machos	Injeção de rotenona (2,5 mg/kg, i.p.) por 10 dias. A melatonina (10 mg/kg, i.p.) foi administrada durante 28 dias após a administração de rotenona.	O tratamento com melatonina protegeu os neurônios dopaminérgicos na SNpc e os níveis estriatais de DA. A melatonina também inibiu o comportamento tipo depressivo, induzido pela rotenona.	BASSANI et al. (2014)
	Ratos Sprague-Dawley machos	Três injeções de rotenona (4,0 µg em 2,0 µL) no feixe prosencefálico medial direito. Os animais receberam melatonina (4,0 µg/mL) na água de beber, 1 semana antes e 9 semanas depois da administração de rotenona.	O tratamento com melatonina protegeu os neurônios dopaminérgicos no estriado e SNpc. A melatonina também impediu a redução dos níveis de DA no estriado e reduziu o comportamento rotacional, induzido pela apomorfina.	CARRIERE; KANG; NILES (2016)

Quadro 2 – Continuação.

Maneb	Células PC12	Incubação (2 h) com melatonina (1 nM) e/ou maneb (1 µg/mL).	A melatonina preveniu a disfunção mitocondrial, a ativação das caspases 3 e 7, perda na viabilidade celular e agregação de α -sinucleína.	ISHIDO (2007)
Maneb + Paraquat	Camundongos Swiss machos	Tratamento com melatonina (30 mg/kg/dia, i.p.) por 9 semanas. Tratamento com maneb (30 mg/kg, i.p.) + paraquat (10 mg/kg, i.p.) 2 vezes por semana, durante 9 semanas, 2 h após a administração de melatonina.	O tratamento com melatonina preveniu a peroxidação lipídica, morte de neurônios dopaminérgicos, o aumento no conteúdo de nitritos e dos níveis de RNAm do citocromo P-450 2E1, induzidos pelas toxinas. A melatonina também aumentou os níveis de glutathiona-S-transferase, P-p53, Bax e caspase 9.	SINGHAL et al. (2011)

Legenda: 6-OHDA: 6-hidroxidopamina; COX: ciclo-oxigenase; DA: dopamina; GDNF: fator neurotrófico derivado da glia; GPx: glutathiona peroxidase; GSH: glutathiona reduzida; i.p.: intraperitoneal; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; MAPK: proteína cinase induzida por mitógeno; MDA: malondialdeído; MPP⁺: 1-metil-4-fenilpiridina; MPTP: 1-metil-4-fenil,1-1,2,3,6-tetrahidropiridina; NF- κ B: fator nuclear- κ B; PGE2: prostaglandina E2; s.c.: subcutâneo; SNpc: parte compacta da substância negra; SOD: superóxido dismutase; TH: tirosina hidroxilase.

Fonte: Mack et al. (2016).

3.2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A atividade neuroprotetora da melatonina em modelos experimentais tem sido demonstrada em diversos trabalhos. Esta atividade neuroprotetora está associada a mecanismos moleculares diversos, que vão desde a neutralização direta de EROs e ERNs, até a ativação de vias que aumentam a proteção contra o estresse celular. Neste sentido, hipotetizamos que a administração de melatonina poderia proteger contra os déficits comportamentais e os danos neuronais induzidos pela administração i.n. de NaDMDC em camundongos.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 Objetivo geral

Este conjunto de experimentos teve como objetivo geral a avaliação da atividade neuroprotetora da melatonina frente as alterações comportamentais e bioquímicas, agudas e crônicas induzidas pela administração i.n. de NaDMDC em camundongos.

3.3.2 Objetivos específicos

- Investigar as possíveis alterações nos níveis diurnos de melatonina em diferentes estruturas cerebrais (BO, estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) de camundongos após a administração i.n. de NaDMDC;
- Avaliar o efeito da administração de 3 diferentes doses de melatonina frente aos déficits comportamentais induzidos pela administração i.n. de NaDMDC em camundongos;
- Avaliar o efeito da melatonina sobre alterações oxidativas e nitrosativas induzidas pela administração i.n. de NaDMDC em diferentes estruturas encefálicas (BO, estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo) de camundongos;
- Investigar o efeito da melatonina sobre as possíveis alterações precoces (24 horas após a última administração de NaDMDC) nos níveis de TNF- α induzidas pela administração i.n. de NaDMDC no BO e estriado de camundongos;
- Investigar o efeito da melatonina sobre as possíveis alterações precoces (24 horas após a última administração de

NaDMDC) no imunoconteúdo da enzima TH, DAT e receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 induzidas pela administração i.n. de NaDMDC no BO e estriado de camundongos;

- Investigar o efeito da melatonina sobre as possíveis alterações precoces (24 horas após a última administração de NaDMDC) nos níveis de dopamina, serotonina, noradrenalina, e seus metabólitos induzidas pela administração i.n. de NaDMDC no BO e estriado de camundongos;

- Avaliar o efeito tardio (até 35 dias) da administração i.n. de NaDMDC, assim como o possível efeito protetor da melatonina sobre a função motora e o estado neurológico de camundongos;

- Avaliar o efeito tardio (até 35 dias) da administração intranasal de NaDMDC, assim como o possível efeito protetor da melatonina, sobre o imunoconteúdo da enzima TH, DAT e receptores melatoninérgicos MT1 e MT2, no BO e estriado de camundongos.

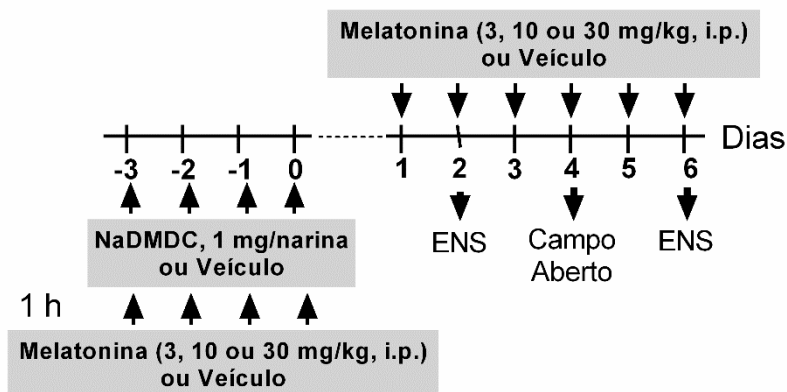
3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Protocolos experimentais

Bloco experimental 1 - Avaliação do efeito da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de melatonina em diferentes estruturas encefálicas. Com o objetivo de investigar se a administração i.n. de NaDMDC poderia modificar os níveis de melatonina no BO, estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo, os animais foram submetidos a 4 administrações em dias consecutivos de NaDMDC (1 mg/narina), ou veículo/controle (10 µL/narina). Posteriormente, as estruturas foram coletadas 24 h ou 7 dias após a última administração.

Bloco experimental 2 - Avaliação do efeito da administração de melatonina sobre as alterações comportamentais induzidas pela administração i.n. de NaDMDC. Para avaliar o possível efeito do tratamento com melatonina sobre os déficits motores induzidos pela administração i.n. de NaDMDC, a melatonina (3, 10, e 30 mg/kg, i.p.), ou veículo/controle (10 mL/kg, i.p.), foram administrados 1 h antes de cada administração de NaDMDC (1 mg/narina), ou veículo/controle (10 µL/narina). A administração de melatonina foi mantida 1 vez ao dia, até o sétimo dia. Após a última administração de NaDMDC, os animais foram submetidos a uma bateria comportamental (Figura 28) semelhante à realizada no capítulo 2 deste trabalho. O tratamento repetido com melatonina foi realizado sempre ao final da tarde, para evitar interferência direta sobre os comportamentos avaliados, e para aproximar os níveis máximos absorvidos de melatonina exógena com o pico de melatonina endógena, a fim de se evitar maiores alterações no ciclo circadiano dos animais.

Figura 28 - Protocolo experimental utilizado para avaliação do efeito da melatonina exógena sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.



Legenda: Linha do tempo ilustrando os tratamentos utilizados e os testes comportamentais. ENS: escore neurológico de severidade.

Bloco experimental 3 - Efeito do pré-tratamento com melatonina sobre as alterações bioquímicas precoces induzidas pela administração i.n. de NaDMDC. Para avaliação do possível efeito protetor do tratamento com melatonina sobre as alterações bioquímicas precoces induzidas pela administração i.n. de NaDMDC, os animais foram tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou veículo/controle (10 mL/kg, i.p.) 1 h antes de cada administração de NaDMDC (1 mg/narina), ou veículo/controle (10 µL/narina). Para maior facilidade na descrição dos resultados e discussão, os grupos foram nomeados e divididos da seguinte maneira:

- **Grupo Controle:** Controle i.p. + Controle i.n.;
- **Grupo NaDMDC:** Controle i.p. + NaDMDC i.n.;
- **Grupo Melatonina:** Melatonina i.p. + Controle i.n.;
- **Grupo Melatonina + NaDMDC:** Melatonina i.p. + NaDMDC

i.n.

As amostras de BO, estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo, foram coletadas 24 h após a última administração de NaDMDC e processadas de acordo com a metodologia utilizada. A dose de melatonina foi selecionada de acordo com os resultados obtidos no bloco experimental 2 deste capítulo.

Para caracterização do perfil oxidativo induzido pelo NaDMDC em diferentes estruturas do encéfalo dos animais e do possível papel neuroprotetor da melatonina, as amostras de BO, estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo, foram processadas para análise por *dot blot*. Esta técnica foi utilizada para quantificar, relativamente ao controle, o conteúdo de 3-nitrotirosina (3-NT), 4-HNE e MDA.

A participação da neuroinflamação na toxicidade exercida pelo NaDMDC e o potencial efeito protetor da melatonina sobre este parâmetro foram avaliados através da quantificação, pelo método de ELISA, dos níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α no BO e estriado dos animais, 24 h após a última administração de NaDMDC.

Para avaliação de possíveis alterações nos sistemas dopaminérgicos e melatoninérgico, provocadas por este protocolo de tratamento, foi realizada a quantificação do imunocontéudo de TH e DAT, assim como dos receptores de melatonina MT1 e MT2, no BO e estriado dos animais. Os níveis dos neurotransmissores dopamina, serotonina e noradrenalina, assim como de seus metabólitos também foram mensurados no BO e estriado, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do Inglês: *high performance liquid chromatography*).

Bloco experimental 4 - Efeitos comportamentais e bioquímicos tardios da administração i.n. de NaDMDC e atividade neuroprotetora da melatonina. Para avaliar se os déficits motores induzidos pela administração i.n. de NaDMDC permaneceriam significativos por mais de 7 dias e se o tratamento com melatonina poderia prevenir o desenvolvimento destes déficits, a melatonina (30 mg/kg, i.p.), ou veículo/controle (10 mL/kg, i.p.), foi administrada 1 h antes de cada administração de NaDMDC (1 mg/narina) ou veículo/controle (10 μ L/narina). Os grupos foram nomeados da seguinte maneira:

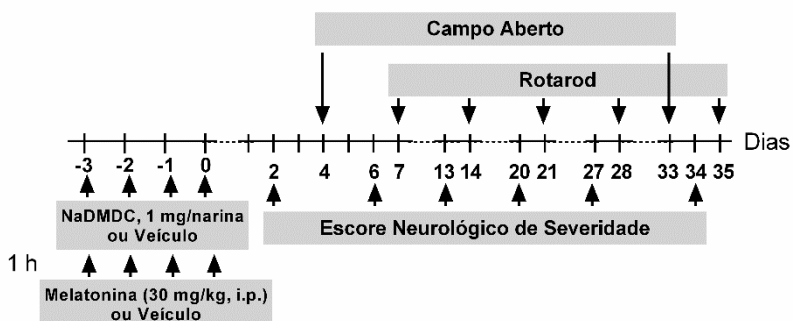
- **Grupo Controle:** Controle i.p. + Controle i.n.;
- **Grupo NaDMDC:** Controle i.p. + NaDMDC i.n.;
- **Grupo Melatonina:** Melatonina i.p. + Controle i.n.;
- **Grupo Melatonina + NaDMDC:** Melatonina i.p. + NaDMDC

i.n.

Posteriormente, os animais foram submetidos a uma bateria de testes comportamentais, composta por: ENS, nos dias 2, 6, 13, 20, 27 e 34; rotarod, nos dias 7, 14, 21, 28 e 35; open field, nos

dias 4 e 33 (Figura 29). Ainda, o peso corporal dos animais foi mensurado antes (basal) e nos dias 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35, após o fim do tratamento. No 35º dia após a última administração do NaDMDC, os animais foram eutanasiados e as amostras de BO e estriado foram coletadas para análise por *Western blotting* do imunoc conteúdo de TH, DAT, MT1 e MT2.

Figura 29 - Protocolo experimental para avaliação do efeito tardio da administração intranasal de NaDMDC e do efeito protetor da melatonina exógena sobre a performance motora e estado neurológico de camundongos.



Legenda: Linha do tempo ilustrando os tratamentos utilizados e a distribuição temporal das avaliações comportamentais.

3.4.2 Animais

Os animais utilizados, assim como suas condições de manutenção foram as mesmas descritas previamente no item 2.4.2, Capítulo 2, página 80.

3.4.3 Drogas

O dimetilditiocarbamato de sódio (NaDMDC) (D156604, Sigma-Aldrich), foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%) a uma concentração de 100 mg/mL. A solução salina foi utilizada para tratar os animais do grupo veículo/controle. A melatonina (M5250, Sigma-Aldrich) foi dissolvida em etanol 1% em solução salina nas concentrações de 0,3 mg/mL, 1 mg/mL e 3 mg/mL, e administradas 10 mL/kg, i.p., para as doses de 3 mg/kg, 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente. A solução de etanol 1% em salina,

10 mL/kg, i.p., foi utilizada para o tratamento do grupo veículo/controle.

3.4.4 Administração intranasal de NaDMDC

A administração i.n. de NaDMDC foi realizada como descrito anteriormente no item 2.4.4, página 81.

3.4.5 Testes comportamentais

3.4.5.1 Campo aberto

A avaliação no teste do campo aberto realizada nos dias 4 e 33, foi realizada de acordo com o protocolo já descrito no item 2.4.6.1, Capítulo 2, página 82.

3.4.5.2 Escore neurológico de severidade

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito no item 2.4.6.2, Capítulo 2, página 83.

3.4.5.3 Rotarod

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo descrito no item 2.4.6.3, Capítulo 2, página 85.

3.4.6 Análises *ex vivo*

As coletas das amostras para a realização das análises *ex vivo* foram realizadas conforme o protocolo descrito no item 2.4.7, Capítulo 2, página 86.

3.4.6.1 *Western blotting*

As análises realizadas pela técnica de *Western blotting* neste capítulo foram semelhantes às descritas no capítulo anterior, com algumas modificações. Após a separação das frações proteicas em gel de poliacrilamida e transferidas para membranas de PVDF, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5%, lavadas e incubadas com solução de Ponceau S (Ponceau S

solution, P7170, Sigma-Aldrich, MO, EUA), para detecção das bandas proteicas transferidas. Esta marcação foi captada por leitura colorimétrica em fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, La Jolla, USA) e utilizada como controle do carregamento de proteínas. Após lavagem para retirada da marcação por Ponceau S, as membranas foram incubadas por 8 horas com anticorpos primários anti-TH (1:5000, sc-25269, Santa Cruz Biotechnology), anti-DAT (ab111468, Abcam 1:10000), anti-MT1 (AMR-031, Alomone, 1:1000) e anti-MT2 (AMR-032, Alomone, 1:1000), e, posteriormente, com os anticorpos secundários apropriados.

3.4.6.2 Dot blot

Para realização da análise por *dot blot*, as amostras foram processadas da mesma forma como descrita para a técnica de Western blotting, apenas ajustando-se a concentração de proteínas para 2,5 mg/mL, com base em testes realizados previamente. Utilizou-se um volume de 2 μ L (5 μ g de proteínas) em cada ponto. As amostras foram pipetadas em duplicata em uma membrana de PVDF ativada. Após a secagem à temperatura ambiente, as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5%, lavadas e incubadas por aproximadamente 8 h com os anticorpos primários anti 3-NT (ab42789, Abcam, 1:5000), anti 4-HNE (ab46545, Abcam, 1:10000) e anti MDA (ab6463, Abcam, 1:5000). Após a retirada dos anticorpos primários e lavagem, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários apropriados. A revelação foi feita com solução quimioluminiscente, utilizando o kit ECL™ (Amersham Biosciences, UK), seguida da detecção em aparelho fotodocumentador (ChemiDoc MP, Bio-Rad, La Jolla, USA). Para controle de carregamento, as membranas foram coradas com solução de coomassie blue e a marcação foi captada por leitura colorimétrica em fotodocumentador (Abcam protocols, 2017).

3.4.6.3 Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

3.4.6.3.1 Fator de Necrose Tumoral- α

A dosagem de TNF- α foi realizada pelo método de ELISA de acordo com o protocolo descrito anteriormente no item 2.4.7.2, Capítulo 2, página 87.

3.4.6.3.2 Dosagem dos níveis de melatonina

As dosagens dos conteúdos de melatonina do BO, estriado, córtex pré-frontal, hipocampo e cerebelo foram realizadas pelo método de ELISA, utilizando-se kit comercial (IBL, Hamburgo, Alemanha). No momento da dosagem as amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas em tampão 25 mM de TRIS-HCL (pH 7,4) gelado contendo 1 mM de EDTA e 1mM de EGTA conforme descrito previamente (PINATO et al., 2015). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas (14,000g, 15 min, 4 °C) e colocadas nos poços de dosagem. O kit utilizado baseia-se na competição entre a melatonina das amostras e melatonina biotinizada fornecida pelo kit, por anticorpos para melatonina presentes nos poços. A quantidade de melatonina biotinizada ligada ao anticorpo foi determinada pela adição de um anticorpo anti-biotina, acoplado a uma enzima, a fosfatase alcalina, cuja reação com o substrato específico fornecido no kit forma um produto colorimétrico, detectado por espectrofotômetro a 405 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, CA, EUA). A quantidade de antígeno biotinizado ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à concentração da amostra. O limite de detecção do kit é de 3 pg/mL e os valores foram normalizados pelo peso de cada amostra.

3.4.6.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção eletroquímica

Os níveis teciduais de dopamina, noradrenalina, serotonina e de seus metabólitos, DOPAC, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), respectivamente, foram determinados através de um sistema modular de HPLC (Waters, modelo Alliance e2695), composto por uma bomba quaternária, desgaseificador, injetor automático refrigerado e um aquecedor de coluna, acoplado a um detector eletroquímico amperométrico modelo Waters 2465 (Waters, Milford, MA, USA). A célula analítica de fluxo é composta por um eletrodo de trabalho de carbono vítreo (GC-WE) com 2 mm de diâmetro, que é operado em corrente contínua de +700 mV, versus um eletrodo de referência de Ag/AgCl *in situ* (ISAAC) e um eletrodo auxiliar de aço inoxidável. Para a extração dos analitos, as amostras de BO e

estriado foram homogeneizadas em uma solução de 0,1 M de ácido perclórico contendo 0,02% de metabissulfito de sódio e uma concentração conhecida de dihidroxibenzilamina (DHBA), como padrão interno. Posteriormente, as amostras foram submetidas a um banho de ultrassom de 40 kHz por 20 min seguidas de centrifugação a 14.000 RPMs durante 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para microtubos do autoinjeter (4°C) e uma alíquota de 20 µL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo a cada 10 minutos. As amostras foram carregadas pela fase móvel composta por 60 mM de fosfato de sódio dibásico, 50 mM de ácido cítrico, 1,2 mM de 1-octanosulfonato de sódio, 0,5 mM de 1-heptanosulfonato de sódio, 2 mM de cloreto de sódio, 50 µM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico, 10% de acetonitrila e água ultrapura (Milli-Q, Millipore), pH = 4,0, filtrada através de uma membrana de acetato de celulose (0,45 µM, Millipore) e desgaseificada a vácuo em banho de ultrassom de 40 kHz por 10 minutos. Utilizou-se um fluxo gradiente (1 – 6 min = 0,20 ml/min; 6 – 10 min = 0,35 ml/min) através de uma pré-coluna (C18) com 20 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno (Alltech, Deerfield, USA) e coluna de fase reversa (C18) modelo Synergi Hydro-RP, 150 mm de comprimento e 2 mm de diâmetro interno, empacotada com 19 partículas de 4 µM de diâmetro (Phenomenex, Torrance, USA), ambas a temperatura de 30°C. O programa computacional Empower 2® (Waters Co.) foi utilizado para controle, aquisição e processamento dos dados, os quais foram mensurados de acordo com as curvas de calibração de cada analito (10 – 1000 ng/ml) e expressos em ng de analito por mg de tecido úmido.

3.4.7 Análise estatística

Os resultados das dosagens da concentração de melatonina foram analisados pelo teste *t* de Student. Os dados do teste do campo aberto e rotarod do bloco experimental 2 foram analisados por ANOVA de 1 via, seguido pelo teste *post-hoc* de Sidak. Os dados do ENS realizado do bloco experimental 2 foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Os resultados obtidos pelas técnicas de *Western blotting*, ELISA, dot blot e HPLC, assim como as avaliações comportamentais no teste do campo aberto do bloco experimental 4, foram avaliados por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste *post-hoc* de Newman-

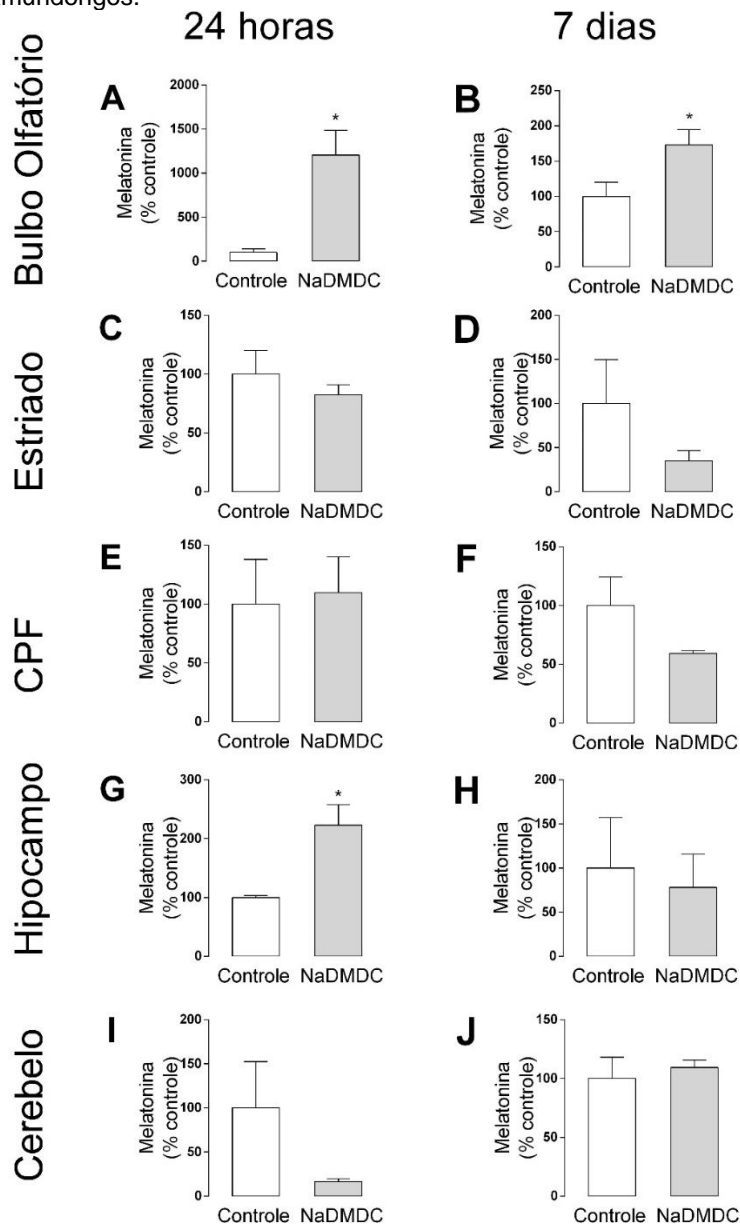
Keuls. Os dados obtidos no teste de rotarod e as mensurações do peso corporal, foram avaliados por ANOVA de duas vias com medida repetida seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls. Os dados do ENS foram primeiramente submetidos a ranking por alinhamento e, posteriormente, analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de Mann-Whitney, com correção de Bonferroni para múltiplas comparações (Higgins, 1990, 1994; Wobbok, 2011). Os resultados foram analisados pelo software STATISTICA® versão 8.0 (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EUA). Em todas as análises, valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas diferenças significativas ($P < 0,05$) indicadas pelos testes t de Student, ou pelos testes de múltiplas comparações foram apresentadas nos gráficos. Quanto aos efeitos significativos ($P < 0,05$) dos fatores experimentais, indicados pelas análises de variâncias, todos estão descritos no texto, mas somente os necessários para a melhor compreensão do trabalho foram apresentados nos gráficos de resultados.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 A administração intranasal de NaDMDC aumenta os níveis de melatonina no bulbo olfatório e hipocampo de camundongos

A Figura 30 apresenta os resultados obtidos da dosagem de melatonina em diferentes estruturas encefálicas 24 h e 7 dias após a última administração de NaDMDC. A avaliação pelo teste *t* de Student demonstrou que o ditiocarbamato não provocou diferenças significativas ($P > 0,05$) nos níveis de melatonina no estriado (Fig. 30, C e D), córtex pré-frontal (Fig. 30, E e F), e cerebelo (Fig. 30, I e H), nos tempos de 24 horas e 7 dias, e no hipocampo (Fig. 30 H), 7 dias após o fim do tratamento. Por outro lado, observou-se um aumento significativo ($P < 0,05$) nos níveis de melatonina no BO (Fig. 30, A e B), 24 horas e 7 dias, e no hipocampo (Fig. 30 G), 24 horas após o fim do tratamento com NaDMDC i.n. em comparação aos animais do grupo controle.

Figura 30 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC sobre os níveis de melatonina em diferentes estruturas encefálicas de camundongos.

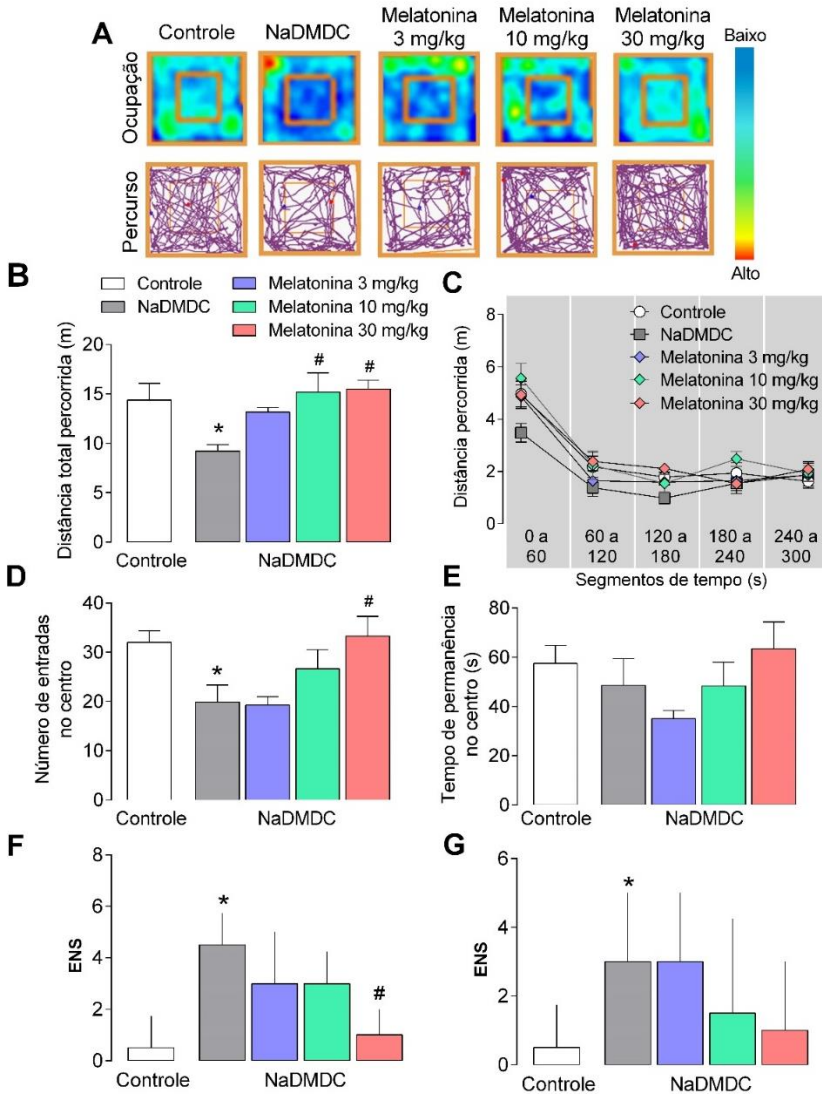


Legenda da Figura 30: Os animais (n=4-5/grupo) foram tratados por 4 dias consecutivos com 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle (10 µL/narina). Após 24 horas (A, C, E, G e I) e 7 dias (B, D, F, H e J) decorridas da última administração, o bulbo olfatório (A e B), o estriado (C e D), o córtex pré-frontal (CPF) (E e F), o hipocampo (G e H) e o cerebelo (I e J), foram coletados para a análise através da metodologia de ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA). Os dados são apresentados em percentual a média do grupo controle e estão representados pela média ± EPM; a avaliação estatística foi realizada através do Teste t de *Student*. * P<0,05 comparados ao grupo Controle.

3.5.2 O tratamento com melatonina previne os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos

A Figura 31 apresenta os dados das avaliações comportamentais do efeito do tratamento com melatonina sobre os déficits motores induzidos pela administração i.n. de NaDMDC. A ANOVA de uma via demonstrou que as médias da distância total percorrida (Fig. 31 B) foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais [$F(4,31)=4,46$, $P<0,05$]. O teste de múltiplas comparações indicou que houve uma redução significativa ($P<0,05$) no grupo NaDMDC em comparação ao grupo Controle, e, ainda, as doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg de melatonina protegeram significativamente ($P<0,05$) os animais deste efeito. Quanto ao parâmetro entradas no centro (Fig. 31 D), as médias dos grupos diferiram significativamente [$F(4,31)=4,415$, $P<0,05$], e o grupo NaDMDC apresentou um número significativamente ($P<0,05$) menor de entradas no centro em comparação ao grupo Controle. A administração de melatonina na dose de 30 mg/kg atenuou de forma significativa ($P<0,05$) este déficit. Em relação ao tempo de permanência no centro do aparato (Fig. 31 E), a ANOVA demonstrou que não houve diferença significativa entre as médias dos grupos [$F(4,31)=1,434$, $P>0,05$].

Figura 31 – Efeitos do tratamento com melatonina sobre os déficits motores induzidos pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos.



Legenda: Os animais (n=7-9/grupo) foram pré-tratados com Melatonina (3, 10 ou 30 mg/kg, intraperitoneal) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos.

Continuação da legenda da Figura 31: O tratamento com melatonina prosseguiu até o 7º dia após a última administração de NaDMDC. Os animais foram submetidos ao teste do escore neurológico de severidade (ENS), nos dias 2 (F) e 6 (G), e campo aberto, no dia 4 (A, B, C, D e E). (A) Imagens representativas da ocupação e do percurso dos animais no campo aberto. (B) Distância total percorrida. (C) Avaliação minuto a minuto da distância percorrida. (D) Número de entradas no centro. (E) Tempo de permanência no centro. (F) ENS dia 2. (G) ENS dia 6. Os dados do campo aberto foram estatisticamente analisados por ANOVA de uma via seguida do teste *post-hoc* de Sidak. O ENS foi avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn. Os dados estão apresentados como a \pm EPM. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo NaDMDC + Controle.

O ENS realizado no dia 2 (Fig. 31 F) após a última administração de NaDMDC, avaliado pelo teste de Kruskal-Wallis, apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) entre as médias, e o teste de Dunn demonstrou que houve um aumento significativo ($P < 0,05$) do ENS nos animais que receberam NaDMDC em comparação ao grupo Controle, e que a dose de 30 mg/kg inibiu de forma significativa ($P < 0,05$) este efeito do ditiocarbamato. No dia 6 (Fig. 31 G), também houve uma diferença significativa entre as médias ($P < 0,05$) e o tratamento com NaDMDC confirmou os dados anteriores, provocando um aumento significativo do ENS ($P < 0,05$) em relação ao Controle. No entanto, neste tempo de avaliação, os grupos que receberam melatonina não diferiram significativamente do grupo NaDMDC.

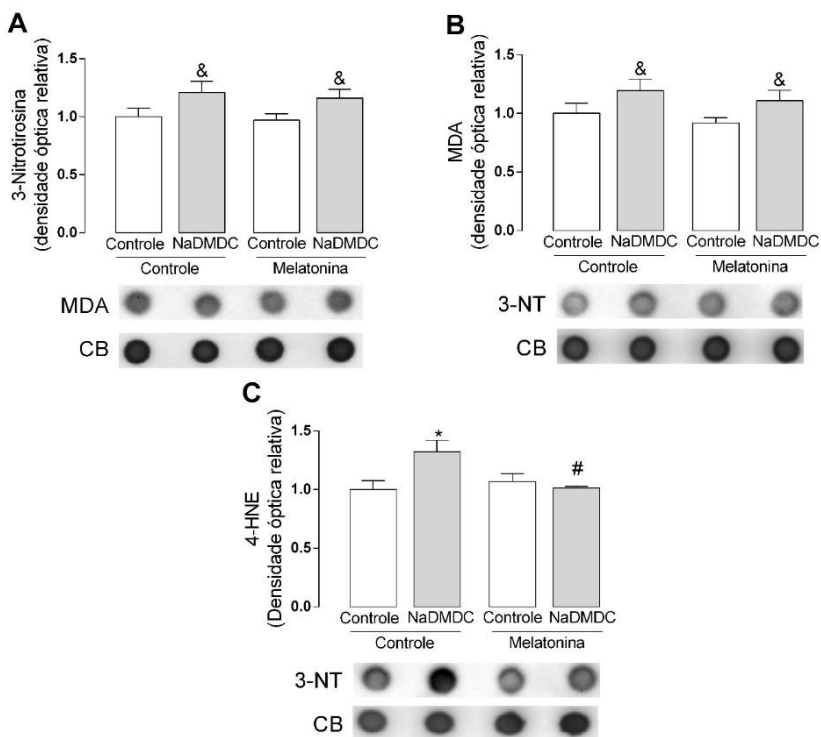
Após estes resultados observou-se que a dose de 30 mg/kg de melatonina foi a mais eficaz na proteção dos déficits provocados pela administração i.n. de NaDMDC e esta dose foi selecionada para a realização dos experimentos subsequentes.

3.5.3 O tratamento com melatonina protege contra o estresse oxidativo/nitrosativo induzido pela administração intranasal de NaDMDC em estruturas encefálicas de camundongos

Os resultados obtidos pela técnica de *dot blot*, com as amostras de BO e estriado, estão apresentados na Figura 32. A ANOVA de duas vias demonstrou que houve efeito significativo do fator NaDMDC/Controle [$F(3,18)=6,67$, $P < 0,05$] quanto ao imunoconteúdo de nitrotirosina no BO (Fig. 32 A). Entretanto, não foram observados efeitos significativo para os fatores

Melatonina/Controle [$F(3,18)=0,26$, $P>0,05$] e interação [$F(3,18)=0,013$, $P>0,05$] neste parâmetro. O teste *post hoc* de Newman-Keuls demonstrou que não houve diferença significativa entre os grupos. Quanto ao imunoconteúdo de MDA (Fig. 32 B), o efeito do fator NaDMDC/Controle também foi significativo [$F(3,18)=5,192$, $P<0,05$]. Por outro lado, os fatores Melatonina/Controle [$F(3,18)=0,991$, $P>0,05$] e interação [$F(3,18)=0,014$, $P>0,05$] não apresentaram efeitos significantivos sobre esse parâmetro. O teste de múltiplas comparações não evidenciou diferenças significativas entre os grupos. Por outro lado, o imunoconteúdo de 4-HNE (Fig. 32 C) demonstrou sofrer influência do fator interação [$F(3,18)=7,527$, $P<0,05$], mas não dos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,18)=3,808$, $P>0,05$] e Melatonina/Controle [$F(3,18)=3,047$, $P>0,05$]. O teste de *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o tratamento com NaDMDC (grupo NaDMDC) foi capaz de aumentar significativamente ($P<0,05$) o imunoconteúdo de 4-HNE, em comparação ao grupo Controle, e que o tratamento com melatonina (grupo Melatonina + NaDMDC) foi eficaz em proteger contra este aumento ($P<0,05$).

Figura 32 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de 3-nitrotirosina, malondialdeído e 4-hidroxinonenal no bulbo olfatório de camundongos.



Legenda: Os animais (n=5-6/grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 horas após a última administração de NaDMDC. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. 3-NT, 3-nitrotirosina. MDA, malondialdeído. 4-HNE, 4-hidroxinonenal. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + NaDMDC. & $P < 0,05$ em relação ao efeito NaDMDC/Controle.

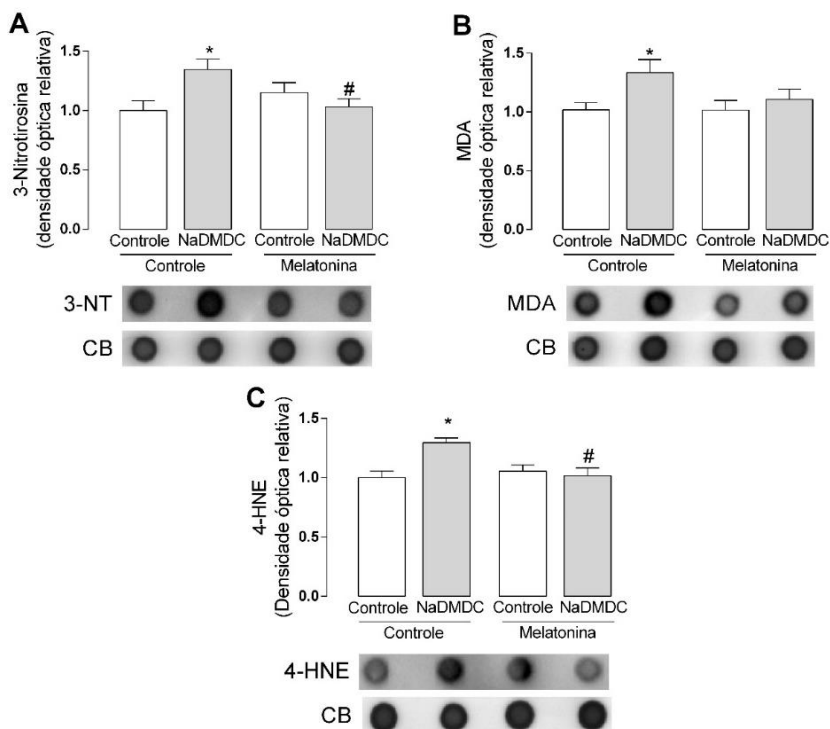
O imunocontéudo de nitrotirosina no estriado (Fig. 33 A) sofreu alterações significativas pelo fator interação [F(3,18)=8,365, $P < 0,05$], mas não foi influenciado pelos fatores NaDMDC/Controle [F(3,18)=1,943, $P > 0,05$] e Melatonina/Controle

[F(3,18)=0,987, P>0,05]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que o grupo NaDMDC apresentou um aumento significativo (P<0,05) deste parâmetro, em comparação ao grupo Controle, e que a melatonina preveniu este aumento, como indicado pela diferença significativa (P<0,05) entre os grupos NaDMDC e Melatonina + NaDMDC. O imunocnteúdo de MDA no estriado (Fig. 33 B) foi modificado significativamente pelo fator NaDMDC/Controle [F(3,18)=5,6713, P<0,05], mas não pelos fatores Melatonina/Controle [F(3,18)=1,8397, P>0,05] e interação [F(3,18)=1,7452, P>0,05]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que houve um aumento significativo (P<0,05) no imunocnteúdo de MDA no estriado no grupo NaDMDC em relação ao grupo controle.

Adicionalmente, os fatores NaDMDC/Controle [F(3,18)=5,319 P<0,05] e interação [F(3,18)=8,877, P<0,05] apresentaram efeitos significativos sobre o imunocnteúdo de 4-HNE no estriado (Fig. 33 C), enquanto o fator Melatonina/Controle [F(3,18)=4,012, P>0,05] não alterou de maneira significativa este parâmetro. O teste de múltiplas comparações demonstrou um aumento significativo (P<0,05) imunocnteúdo de 4-HNE no estriado de animais do grupo NaDMDC em comparação ao grupo Controle. Os animais do grupo Melatonina + NaDMDC apresentaram o imunocnteúdo de 4-HNE no estriado significativamente menor (P<0,05), em comparação aos animais do grupo NaDMDC.

Os dados da análise dos metabólitos do estresse oxidativo no córtex pré-frontal, hipocampo e estriado, realizada pela técnica de *dot blot*, estão apresentados na Tabela 2. A análise estatística indicou um efeito significativo do fator NaDMDC/Controle para o imunocnteúdo de nitrotirosina no córtex pré-frontal, e de MDA e 4-HNE no hipocampo. O fator Melatonina/Controle e a interação dos fatores tiveram efeito significativo apenas para os níveis de nitrotirosina no córtex pré-frontal. O teste de múltiplas comparações demonstrou um aumento significativo nos níveis de nitrotirosina no córtex pré-frontal do grupo NaDMDC em comparação ao controle e uma redução significativa no grupo Melatonina + NaDMDC em comparação ao grupo NaDMDC. Ainda, o teste *post-hoc* de Newman-Keuls também demonstrou um aumento significativo de MDA no hipocampo dos animais do grupo NaDMDC, em comparação aos animais do grupo controle.

Figura 33 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de 3-nitrotirosina, malondialdeído e 4-hidroxinonal no estriado de camundongos.



Legenda: Os animais (n=5-6/grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 horas após a última administração de NaDMDC. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. 3-NT, 3-nitrotirosina; MDA, malondialdeído; 4-HNE, 4-hidroxinonal. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + NaDMDC.

Tabela 2 - continuação.

Fator									
NaDMDC/Controle: Efeito significativo? (P<0,05)	Sim	Não	Não	Não	Sim	Sim	Não	Não	Não
Fator									
Melatonina/Controle: Valor de F	4,67	0,535	0,976	1.972	1.798	0.005	0.370	0.191	0.236
Fator									
Melatonina/Controle: Efeito significativo? (P<0,05)	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Fator interação: Valor de F									
	7,43	0,536	0,0004	0.037	0.1739	0.903	0.407	4.026	0.7208
Fator interação: Efeito significativo? (P<0,05)									
	Sim	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Não

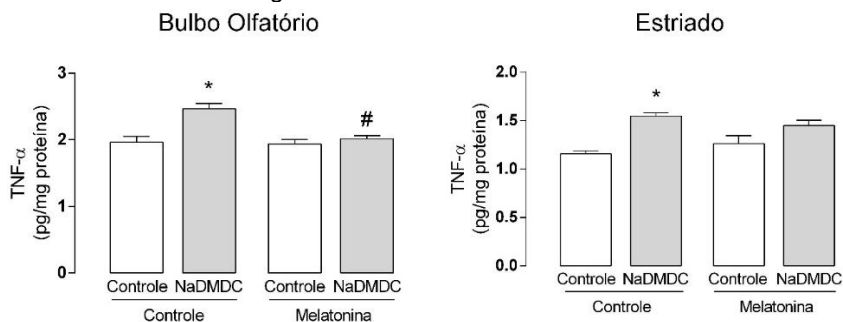
Legenda: NT, nitrotirosina. MDA, malondialdeído. 4-HNE, 4-hidroxinonal. NaDMDC, dimetilditiocarbamato de sódio. EPM, erro padrão da média. * P<0,05 em comparação com o grupo controle. #P<0.05 em comparação ao grupo NaDMDC.

3.5.4 O tratamento com melatonina protege contra o aumento nos níveis de TNF induzidos pela administração intranasal de NaDMDC no bulbo olfatório e estriado de camundongos

A Figura 34 apresenta os níveis da citocina TNF- α no BO e no estriado dos animais. Com relação aos níveis de TNF- α no BO (Fig. 34 A), a ANOVA de duas vias indicou efeitos significativos para os fatores NaDMDC/Controle [$F(3,20)=16,947$, $P<0,05$], Melatonina/Controle [$F(3,20)=11,221$, $P<0,05$] e interação [$F(3,20)=9,163$, $P<0,05$] apresentaram efeito significativo. O teste de múltiplas comparações demonstrou que houve aumento significativo ($P<0,05$) dos níveis dessa citocina nos animais do grupo NaDMDC, em comparação aos animais do grupo controle. Ainda, os animais do grupo Melatonina + NaDMDC apresentaram níveis reduzidos de TNF- α em comparação ao grupo NaDMDC.

Com relação aos resultados obtidos no estriado (Fig. 34 B), apenas o fator NaDMDC/Controle apresentou efeito significativo [$F(3,20)=28,607$, $P<0,05$], sendo que os fatores Melatonina/Controle [$F(3,20)=0,007$, $P>0,05$] e a interação [$F(3,20)=3,612$, $P>0,05$], não tiveram efeito significativo. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que houve um aumento significativo ($P<0,05$) nos níveis de TNF- α no grupo NaDMDC em comparação ao grupo Controle, entretanto a melatonina não foi capaz de prevenir o aparecimento deste efeito (Melatonina + NaDMDC x NaDMDC, $P>0,05$).

Figura 34 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de TNF- α no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



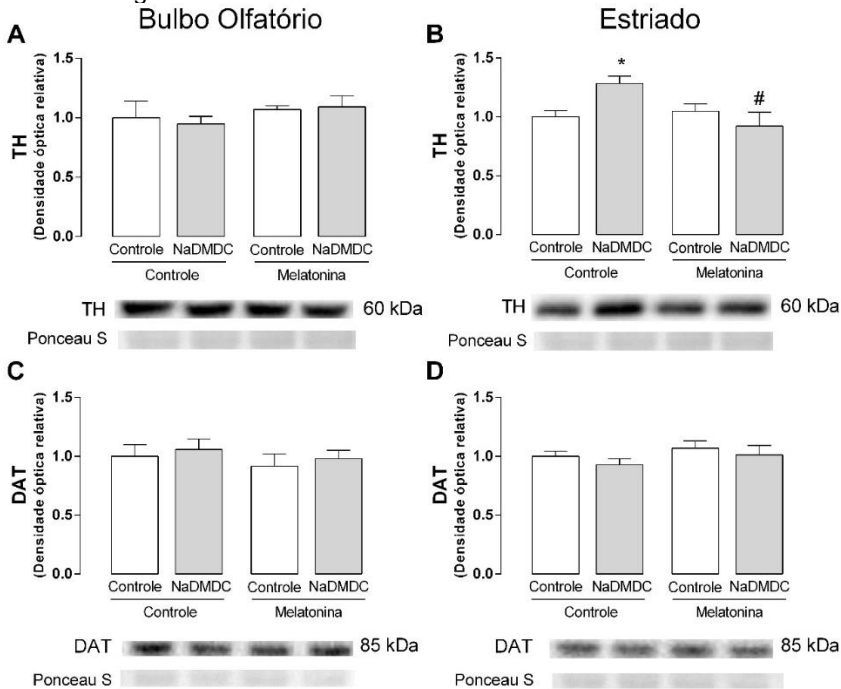
Legenda: Os animais ($n=6$ /grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 horas após a última administração de NaDMDC. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ comparado ao grupo Controle + Controle. # $P<0,05$ comparado ao grupo Controle + NaDMDC.

3.5.5 O tratamento com melatonina inibe o aumento no imunocontéudo de tirosina hidroxilase no estriado induzido pela administração intranasal de NaDMDC em camundongos

O imunocontéudo de TH no BO (Fig. 35 A) não foi alterado significativamente pelos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,20)=0,0256$, $P>0,05$], Melatonina/Controle [$F(3,20)=1,3217$, $P>0,05$] e a sua interação [$F(3,20)=0,1618$, $P>0,05$]. Com relação ao imunocontéudo de TH no estriado, este parâmetro não foi alterado de maneira significativa pelos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,20)=1,0548$, $P>0,05$] e Melatonina/Controle [$F(3,20)=4,0701$, $P>0,05$], entretanto a interação entre estes fatores promoveu alterações significativas neste parâmetro [$F(3,20)=7,0566$, $P<0,05$] (Fig. 35 B). O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que houve um aumento significativo ($P<0,05$) no imunocontéudo de TH no grupo NaDMDC, e que o tratamento com melatonina (grupo Melatonina + NaDMDC) significativamente ($P<0,05$) preveniu este efeito. A análise realizada pela ANOVA de duas vias indicou que o imunocontéudo de DAT no BO (Fig. 35 C)

e estriado (Fig. 35 D) não foi alterado significativamente pelos fatores NaDMDC/Controle {BO [F(3,20)=0,4388, P>0,05] e estriado [F(3,20)=1,086, P>0,05]}, Melatonina/Controle {BO [F(3,20)=0,7532, P>0,05] e estriado [F(3,20)=1,611, P>0,05]} e interação {BO [F(3,20)=0,0013, P>0,05] e estriado [F(3,20)=0,013, P>0,05]}.

Figura 35 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunocnteuído de tirosina hidroxilase e transportador de dopamina no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



Legenda: Os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 horas após a última administração de NaDMDC. TH, tirosina hidroxilase; DAT, transportador de dopamina. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. * P < 0,05 comparado ao grupo Controle + Controle. # P<0,05 comparado ao grupo Controle + NaDMDC.

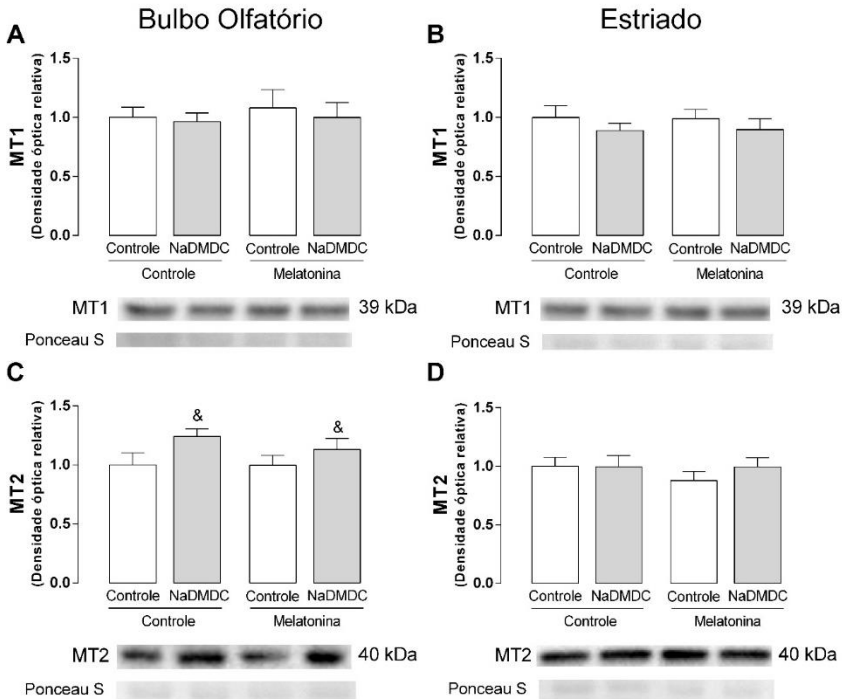
3.5.6 A administração intranasal de NaDMDC induz o aumento no imunoconteúdo do receptor melatoninérgico MT2 no bulbo olfatório de camundongos

A Figura 36 apresenta os dados com relação a quantificação do imunoconteúdo dos receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no BO e estriado de camundongos após os tratamentos com NaDMDC e melatonina. A análise pela ANOVA de duas vias demonstrou que o imunoconteúdo de receptores MT1 não foi alterado no BO (Fig. 36 A) pelos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,20)=0,2669$, $P>0,05$], Melatonina/Controle [$F(3,20)=0,2608$, $P>0,05$] e interação [$F(3,20)=0,0378$, $P>0,05$].

Da mesma forma, a ANOVA de duas vias demonstrou que o imunoconteúdo de receptores MT1 não foi alterado significativamente no estriado (Fig. 36 B) pelos fatores NaDMDC/Controle [$F(3,20)=1,4746$, $P>0,05$], Melatonina/Controle [$F(3,20)=0,0005$, $P>0,05$] e interação [$F(3,20)=0,011$, $P>0,05$].

Por outro lado, no BO (Fig. 36 C) o fator NaDMDC/Controle [$F(3,20)=4,5217$, $P<0,05$] teve efeito significativo sobre o imunoconteúdo de MT2, no entanto os fatores Melatonina/Controle [$F(3,20)=0,4049$, $P>0,05$] e interação [$F(3,20)=0,379$, $P>0,05$] demonstraram não alterar significativamente este parâmetro. O teste *post hoc* de Newman-Keuls não encontrou diferenças significativas entre os grupos experimentais analisados. Com relação ao imunoconteúdo de MT2 no estriado (Fig. 36 D), nenhum dos fatores foi capaz de alterar de maneira significativa este parâmetro: NaDMDC/Controle [$F(3,20)=0,4596$, $P>0,05$], Melatonina/Controle [$F(3,20)=0,5419$, $P>0,05$] e interação [$F(3,20)=0,53$, $P>0,05$].

Figura 36 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoc conteúdo de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



Legenda: Os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados com Melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 horas após a última administração de NaDMDC. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. & $P < 0,05$ em relação ao efeito NaDMDC/Controle.

3.5.7 A administração intranasal de NaDMDC provoca uma redução nos níveis de dopamina no estriado de camundongos

A Figura 37 apresenta os resultados da dosagem de dopamina, DOPAC e o *turnover* (DOPAC/dopamina) no BO e estriado. A ANOVA de duas vias demonstrou que no BO não

houve efeito significativo dos fatores estudados sobre os níveis de dopamina (Fig. 37 A) {NaDMDC/Controle [F(3,20)=1,0276, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,0451, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,3151, P>0,05]}, DOPAC (Fig. 37 C) {NaDMDC/Controle [F(3,20)=0,0004, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,0261, P>0,05] e interação [F(3,20)=3,8729, P>0,05]} e sobre o *turnover* (Fig. 37 E) {NaDMDC/Controle [F(3,20)=1,2392, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,0001, P>0,05] e interação [F(3,25)=1,2725, P>0,05]}.

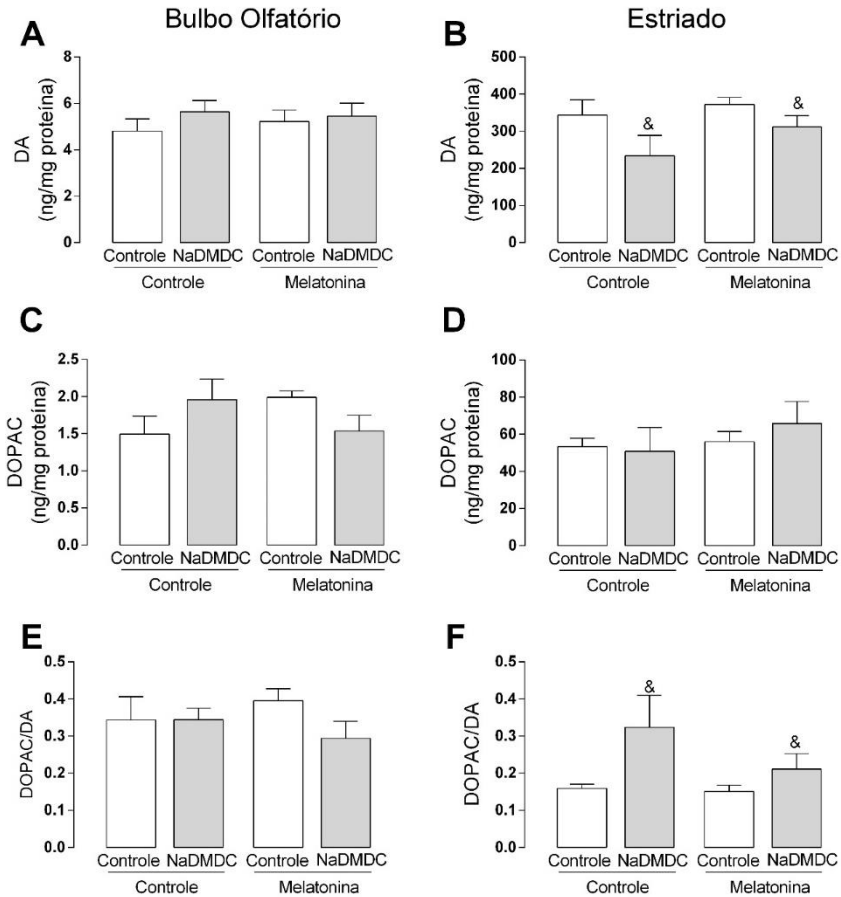
Os resultados dos níveis de noradrenalina, serotonina, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA, respectivamente) e o *turnover* no BO estão apresentados na Tabela 3. Como observado, o fator interação teve efeito significativo nos níveis de MHPG, serotonina e 5-HIAA. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que os grupos NaDMDC e Melatonina apresentaram níveis significativamente maiores de serotonina em comparação ao grupo controle.

No estriado, os níveis de dopamina (Fig. 37 B) foram alterados significativamente pelo fator NaDMDC/Controle [F(3,20)=4,3893, P<0,05], demonstrando que a administração do NaDMDC foi capaz de alterar os níveis deste neurotransmissor. Os fatores Melatonina/Controle [F(3,20)=1,7468, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,4092, P>0,05] não tiveram efeitos significativos. O teste de múltiplas comparações não encontrou diferenças significativas entre os grupos.

O *turnover* de dopamina no estriado (Fig. 37 F) foi modificado de modo significativo pelo fator NaDMDC/Controle [F(3,20)=4,2953, P<0,05], mas não pelos fatores Melatonina/Controle [F(3,20)=1,2449, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,9258, P>0,05]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls não encontrou indícios de diferenças significativas entre os grupos.

Os níveis de DOPAC não foram modificados significativamente pelos fatores experimentais [F(3,20)=1,1381, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,7999, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,4001, P>0,05]. A Tabela 4 apresenta os resultados dos níveis de noradrenalina, serotonina, seus metabólitos (MHPG e 5-HIAA, respectivamente) e o *turnover* no estriado. Como demonstrado, os fatores experimentais não tiveram efeito significativo nesses parâmetros.

Figura 37 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de dopamina, DOPAC e o turnover no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



Legenda: Os animais (n=6/grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 24 horas após a última administração de NaDMDC. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida pelo teste post-hoc de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. & P<0,05 em relação ao efeito NaDMDC/Controle.

Tabela 3 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de noradrenalina, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético no bulbo olfatório de camundongos.

Analito	NA ng/mg	MHPG ng/mg	MHPG/ NA	5-HT ng/mg	5-HIAA ng/mg	5-HIAA/ 5-HT
Média ± EPM grupo Controle	5,697 ±0,698	0,9376 ±0,259	0,1504 ±0,038	9,112 ±1,212	4,322 ±0,729	0,4808 ±0,052
Média ± EPM grupo NaDMDC	7,102 ±0,498	1,864 ±0,223	0,2634 ±0,026	14,20 ±1,106*	5,849 ±0,683	0,4173 ±0,048
Média ± EPM grupo Melatonina	6,111 ±0,502	1,741 ±0,372	0,2831 ±0,057	14,93 ±1,227*	6,659 ±0,477	0,4621 ±0,052
Média ± EPM grupo Melatonina + NaDMDC	5,655 ±0,463	1,493 ±0,199	0,2742 ±0,049	12,19 ±1,421	0,096 ±0,522	0,4236 ±0,018
Fator NaDMDC/Controle: Valor de F	0,7103	1,6032	1,5116	0,8977	0,0008	1,1798
Fator NaDMDC/Controle: Efeito significativo? (P<0,05)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Fator Melatonina/Controle: Valor de F	0,8429	0,6517	2,8719	2,3569	1,5118	0,0174

Tabela 3 – Continuação.

Fator Melatonina/Controle: Efeito significativo? (P<0,05)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Fator interação: Valor de F	2,,7322	4,8045	2,0722	9,9144	5,7551	0,0711
Fator interação: Efeito significativo? (P<0,05)	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Não

Legenda: NaDMDC, dimetilditiocarbamato de sódio. NA, Noradrenalina. MHPG, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol. 5-HT, serotonina. 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético. EPM, erro padrão da média. * P<0,05 em comparação com o grupo Controle.

Tabela 4 - Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre os níveis de noradrenalina, 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol, serotonina e ácido 5-hidroxiindolacético no estriado de camundongos.

Analito	NA ng/mg	MHPG ng/mg	MHPG/ NA	5-HT ng/mg	5-HIAA ng/mg	5-HIAA/ 5-HT
Média ± EPM grupo Controle	7,233 ±0,433	0,1276 ±0,049	0,0177 ±0,006	15,26 ±1,081	14,21 ±1,638	0,9249 ±0,056
Média ± EPM grupo NaDMDC	10,11 ±2,515	0,7285 ±0,037	0,0122 ±0,006	15,52 ±1,057	17,00 ±2,058	1,117 ±0,142
Média ± EPM grupo Melatonina	6,425 ±6,530	0,1906 ±0,067	0,0272 ±0,008	17,01 ±1,304	14,06 ±0,770	0,8414 ±0,059
Média ± EPM grupo Melatonina + NaDMDC	6,426 ±0,640	0,1212 ±0,035	0,0206 ±0,006	13,99 ±0,542	12,96 ±1,057	0,9272 ±0,070
Fator NaDMDC/Controle: Valor de F	0,9027	1,6987	0,7657	1,541	0,2778	2,1998
Fator NaDMDC/Controle: Efeito significativo? (P<0,05)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Fator Melatonina/Controle: Valor de F	1,7322	1,2157	1,2492	0,7815	1,2076	3,7796

Tabela 4 – Continuação.

Fator Melatonina/Controle: Efeito significativo? (P<0,05)	Não	Não	Não	Não	Não	Não
Fator interação: Valor de F	0,6224	0,0470	0,0551	0,5726	1,0208	1,0650
Fator interação: Efeito significativo? (P<0,05)	Não	Não	Não	Não	Não	Não

Legenda: NaDMDC: dimetilditiocarbamato de sódio; NA: Noradrenalina; MHPG: 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol; 5-HT: serotonina; 5-HIAA: ácido 5-hidroxiindolacético; EPM: erro padrão da média.

3.5.8 O tratamento com melatonina protege contra déficit motor tardio induzido pela administração intranasal de NaDMDC

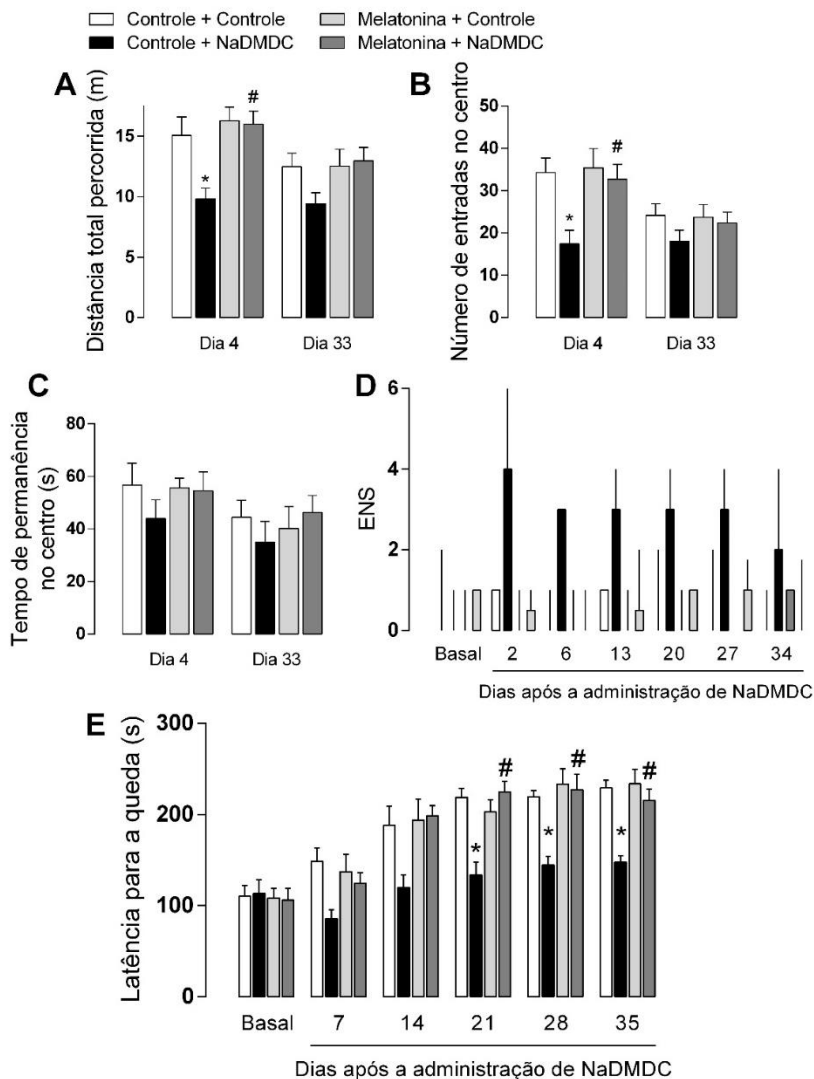
A Figura 38 apresenta os dados comportamentais das avaliações realizadas até o 35º dia após a última administração de NaDMDC. A distância total percorrida (Fig. 38 A) no teste do campo aberto, no dia 4 foi alterada significativamente pelos fatores NaDMDC/Controle [F(3,25)=5,2523, P<0,05] e Melatonina/Controle [F(3,25)=10,2339, P<0,05], mas não pela interação destes fatores [F(3,25)=4,1903, P>0,05]. O teste de Newman-Keuls demonstrou que a administração i.n. de NaDMDC provocou uma redução significativa (P<0,05) na distância percorrida, em comparação aos animais do grupo controle, e que o tratamento com melatonina foi eficaz em prevenir este déficit (P<0,05). Da mesma forma, o número de entradas no centro (Fig. 38 B) também demonstrou efeito significativo dos parâmetros NaDMDC/Controle [F(3,25)=6,96, P<0,05] e Melatonina/Controle [F(3,25)=4,9435, P<0,05], mas não da interação [F(3,25)=3,6662, P>0,05]. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls indicou que, assim como no parâmetro anterior, o NaDMDC provocou redução no número de entradas no centro (P<0,05) e o tratamento com melatonina preveniu significativamente (P<0,05) o aparecimento deste déficit locomotor. No entanto, o tempo de permanência no centro (Fig. 38 C) não foi alterado pelos fatores avaliados no experimento {NaDMDC/Controle [F(3,25)=2,7124, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,25)=1,786, P>0,05] e interação [F(3,25)=2,2544, P>0,05]}.

Quanto aos resultados obtidos no teste do campo aberto realizado no dia 33, os principais parâmetros avaliados não foram alterados por nenhum dos fatores: distância total percorrida (Fig. 38 A) {NaDMDC/Controle [F(3,25)=3,473, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,25)=3,3089, P>0,05] e interação [F(3,25)=1,3914, P>0,05]}; número de entradas no centro (Fig. 38 B) {NaDMDC/Controle [F(3,25)=1,8506, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,25)=0,5148, P>0,05] e interação [F(3,25)=0,7628, P>0,05]}; e o tempo de permanência no centro (Fig. 38 C) {NaDMDC/Controle [F(3,25)=0,0359, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,25)=1,0135, P>0,05] e interação [F(3,25)=0,992, P>0,05]} não foram alterados pelos fatores avaliados no estudo.

A Figura 38 D, apresenta dos dados obtidos no teste do ENS, em diferentes tempos após a administração de NaDMDC e melatonina. Os fatores NaDMDC/Controle [$F(3,25)=0,0583$, $P>0,05$], Melatonina/Controle [$F(3,25)=0,0168$, $P>0,05$] e tempo [$F(3,25)=0,0075$, $P>0,05$] não tiveram efeito significativo sobre esse parâmetro, como demonstrado pela ANOVA de duas vias com medidas repetidas. No entanto, a interação entre os 3 fatores apresentou efeito significativo [$F(3,25)=3,2131$, $P<0,05$]. O teste de múltiplas comparações não encontrou diferenças significativas ($P>0,05$) entre os grupos experimentais.

Quanto ao tempo de latência para a queda, avaliado pelo teste do rotarod (Fig. 38 E), os fatores NaDMDC/Controle [$F(3,25)=31,738$, $P<0,05$], melatonina veículo [$F(3,25)=2,226$, $P<0,05$], tempo [$F(3,25)=39,874$, $P<0,05$] e a interação [$F(3,25)=3,654$, $P<0,05$], apresentaram efeitos significativos. O teste *post-hoc* de Newman-Keuls demonstrou que nos dias 14, 21, 28 e 35, houve uma redução significativa ($P<0,05$) no tempo de latência para a queda nos animais do grupo NaDMDC em comparação aos animais do grupo controle, e que o tratamento com melatonina (grupo Melatonina +NaDMDC) significativamente ($P<0,05$) inibiu este efeito do ditiocarbamato, nestes mesmos tempos.

Figura 38 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre a função motora e estado neurológico geral de camundongos.



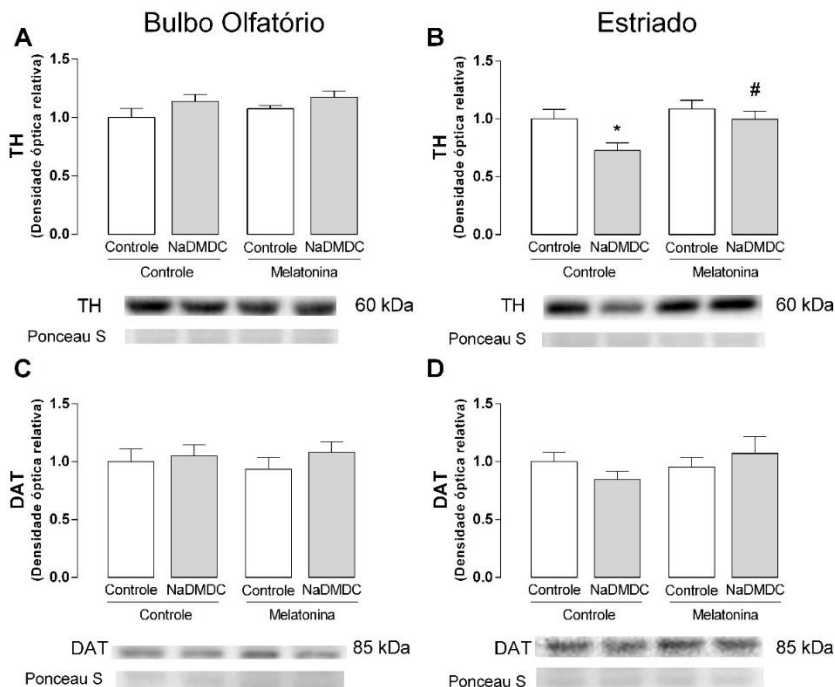
Legenda: Os animais (n=7-9/grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos.

Continuação da legenda da Figura 38: Os animais foram submetidos aos testes do campo aberto (dia 4 e 33) (A, B e C), escore neurológico de severidade (ENS) (basal e dias 2, 6, 13, 20, 27 e 34) (D) e rotarod (basal e dias 7, 14, 21, 28 e 35) (E). (A) Distância total percorrida. (B) Número de entradas no centro, (C) Tempo de permanência no centro. Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA de duas vias com medidas repetidas. A análise de múltiplas comparações para os parâmetros do campo aberto e rotarod foram feitas pelo teste *post-hoc* de Newman-Keuls e os dados são expressos como a média \pm EPM. As múltiplas comparações para o ENS foram feitas pelo teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni. Os dados são expressos como a mediana \pm intervalo interquartil. * $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + Controle. # $P < 0,05$ comparado ao grupo Controle + NaDMDC.

3.5.9 O tratamento com melatonina protege contra a redução tardia no imunoconteúdo de tirosina hidroxilase induzida pela administração intranasal de NaDMDC

A análise por *Western blotting* do imunoconteúdo de TH no BO (Fig. 39 A) demonstrou que os fatores estudados não alteraram significativamente este parâmetro {NaDMDC/Controle [F(3,20)=4,141, $P > 0,05$], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,907, $P > 0,05$] e interação [F(3,20)=0,113, $P > 0,05$]}. No estriado (Fig. 39 B), o imunoconteúdo de TH foi alterado significativamente pelos fatores NaDMDC/Controle [F(3,20)=6,0925, $P < 0,05$] e Melatonina/Controle [F(3,20)=5,847, $P < 0,05$], mas não pelo fator interação [F(3,20)=1,5339, $P > 0,05$]. O teste de múltiplas comparações evidenciou uma redução significativa ($P < 0,05$) no grupo NaDMDC, em relação ao grupo controle. A redução no imunoconteúdo de TH não ocorreu nos animais que receberam o tratamento com melatonina, sendo que houve diferença significativa ($P < 0,05$) do grupo Melatonina + NaDMDC, em comparação com o grupo NaDMDC. A ANOVA de duas vias demonstrou que o imunoconteúdo de DAT não foi alterado no BO (Fig. 39 C) {NaDMDC/Controle [F(3,20)=0,9761, $P > 0,05$], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,0279, $P > 0,05$] e interação [F(3,20)=0,2483, $P > 0,05$] e no estriado (Fig. 39 D) {NaDMDC/Controle [F(3,20)=0,0569, $P > 0,05$], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,2042, $P > 0,05$] e interação [F(3,20)=0,8239, $P > 0,05$] pelos fatores experimentais.

Figura 39 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de tirosina hidroxilase e do transportador de dopamina no estriado de camundongos.

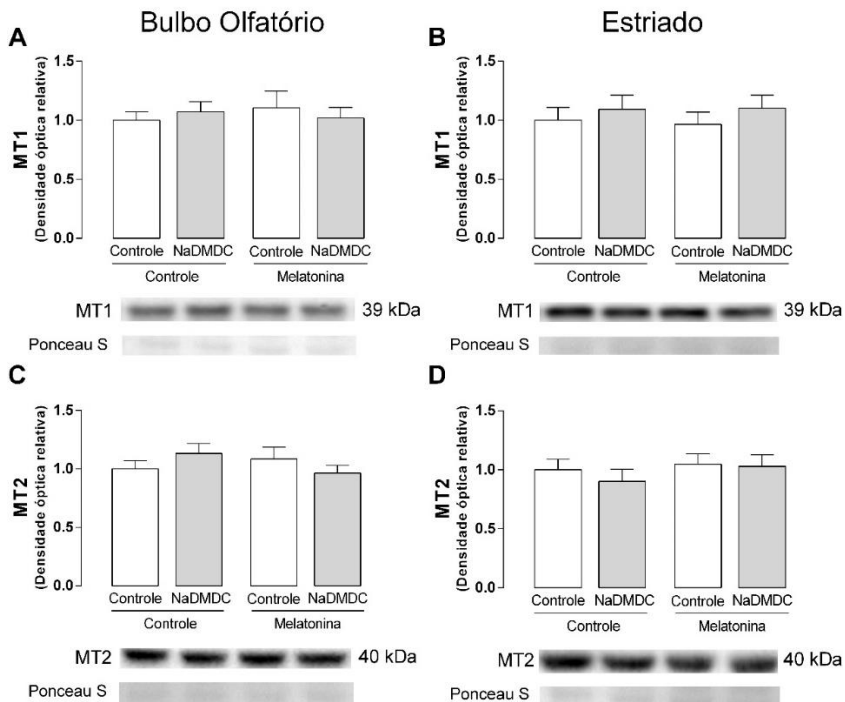


Legenda: Os animais ($n=6$ /grupo) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 35 dias após a última administração de NaDMDC. TH, tirosina hidroxilase; DAT, transportador de dopamina. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM. * $P<0,05$ em relação ao grupo Controle.

3.5.10 A administração intranasal de NaDMDC e o tratamento com melatonina não influenciam de forma tardia o imunoconteúdo de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no bulbo olfatório e estriado de camundongos

A avaliação tardia (35 dias após a última administração de NaDMDC) do imunoconteúdo dos receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 mostrou ausência de alterações significativas no BO (Fig. 40, A e C) e estriado (Fig. 40, B e D) dos fatores estudados sobre MT1 {BO: NaDMDC/Controle [F(3,20)=0,0094, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,0566, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,6479, P>0,05]; estriado: NaDMDC/Controle [F(3,20)=1,0647, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,0119, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,0377, P>0,05]} e MT2 {BO: NaDMDC/Controle [F(3,20)=0,0051, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,2558, P>0,05] e interação [F(3,20)=2,3743, P>0,05]; estriado: NaDMDC/Controle [F(3,20)=0,3672, P>0,05], Melatonina/Controle [F(3,20)=0,8287, P>0,05] e interação [F(3,20)=0,1752, P>0,05]}.

Figura 40 – Efeitos da administração intranasal de NaDMDC e do tratamento com melatonina sobre o imunoconteúdo de receptores melatoninérgicos MT1 e MT2 no bulbo olfatório e estriado de camundongos.



Legenda: Os animais ($n=6/\text{grupo}$) foram pré-tratados com melatonina (30 mg/kg, i.p.) ou Controle, 1 hora antes da administração de 1 mg/narina/dia de NaDMDC ou Controle por 4 dias consecutivos. As amostras foram coletadas 35 dias após a última administração de NaDMDC. Os dados foram estatisticamente analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* de Newman-Keuls e representam a média \pm EPM.

3.6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste capítulo evidenciam a modulação do sistema melatoninérgico pela administração i.n. de NaDMDC em camundongos, além de reforçar os dados obtidos no capítulo anterior com relação a ação pró-oxidante deste ditiocarbamato. Demonstrou-se ainda a atividade neutroprotetora da melatonina exógena, caracterizada pela prevenção do aparecimento de déficits comportamentais (precoces e tardios), estresse oxidativo/nitrosativo, neuroinflamação, além de alterações na via dopaminérgica nigroestriatal induzidos pela administração i.n. de NaDMDC em camundongos.

Nossos resultados demonstraram pela primeira vez que a administração i.n. de NaDMDC é capaz de provocar aumento nos níveis diurnos de melatonina em estruturas encefálicas. Este aumento foi transitório, no caso do hipocampo, enquanto que no BO permaneceu até o sétimo dia após a última administração do ditiocarbamato. Tendo em vista a característica anfifílica da melatonina, a qual permite que a produção advinda dos pinealócitos seja distribuída uniformemente pelo encéfalo, além do fato de que as estruturas foram coletadas durante o dia, quando produção pela glândula pineal é baixa, é possível que grande parte da melatonina quantificada seja proveniente de fontes extrapineais.

A produção extrapineal de melatonina no encéfalo pode ter origem em astrócitos, como apresentado no trabalho de Liu e colaboradores (2007), onde demonstrou-se que astrócitos do córtex cerebral de ratos são capazes de sintetizar melatonina *in vitro*. Além disso, este estudo demonstrou a presença de serotonina, precursora da melatonina, e das enzimas AANAT e ASMT, responsáveis pela síntese deste hormônio nestas mesmas células. Ainda, a produção astrocitária demonstrou não sofrer alterações do ciclo circadiano, como é o caso da produção pela glândula pineal.

Além de astrócitos, a microglia também pode ser responsável pela produção local de melatonina no SNC (MARKUS et al., 2007). No estudo de Pinato e colaboradores (2015) demonstrou-se a colocalização da enzima AANAT com a proteína IBA-1 (marcação para micróglia) no córtex, hipocampo e cerebelo de ratos submetidos a administração de lipopolissacarídeo (LPS) nos ventrículos laterais. O aumento da produção de melatonina

extrapineal foi relacionada com uma neuroproteção de neurônios cerebelares. Da mesma forma, em nosso estudo, o aumento da produção de melatonina no BO pode estar relacionado a uma proteção deste tecido. No capítulo 2 deste trabalho, demonstramos que não ocorre alteração da permeabilidade da membrana celular e os níveis de EROs são normalizados 24 horas após a última administração de NaDMDC, neste tecido. Estes dados diferem dos encontrados no estriado, onde ocorreu aumento da permeabilidade da membrana e os níveis de EROs permaneceram elevados no tempo de 24 horas. A seletividade do BO e hipocampo para a produção de melatonina após a administração i.n. de melatonina ainda necessitam de mais estudos para sua melhor compreensão.

Considerando a literatura demonstrando os efeitos benéficos da melatonina em modelos animais da DP induzidos pela administração de toxinas, além do possível efeito protetor da produção de melatonina endógena no BO após a administração de NaDMDC, investigamos as propriedades protetoras da administração de 3 diferentes doses de melatonina. Demonstramos pela primeira vez que a administração de melatonina foi capaz de proteger contra os déficits motores provocados pela administração i.n. de NaDMDC. As doses de 10 mg e 30 mg/kg foram eficazes em proteger contra a redução da locomoção no campo aberto, enquanto a dose de 30 mg/kg protegeu contra o aumento no ENS no dia 2. Estudos prévios têm demonstrado que a melatonina pode atuar por diferentes mecanismos em diferentes doses. Doses baixas estão relacionadas a ação protetora dependente da ativação de seus receptores MT1 e MT2 e aumento das defesas antioxidantes, enquanto doses mais elevadas estão relacionadas a propriedade neutralizadora (“scavenger”) de radicais livres da molécula de melatonina (MARTIN et al., 2014). Neste sentido, tendo em vista o aumento da produção de EROs induzido pela administração i.n. de NaDMDC, nossos dados indicam que a melatonina pode estar atuando combatendo o estresse oxidativo e, possivelmente, evitando alterações neuronais nestes animais.

Com o intuito de aprofundar o entendimento sobre a toxicidade do NaDMDC, assim como investigar o efeito neuroprotetor da melatonina sobre esta toxicidade, avaliamos o imunocnteúdo de três metabólitos produzidos em situações de estresse oxidativo/nitrosativo, 3-NT, 4-HNE e MDA, 24 horas após

a última administração de NaDMDC, no BO, córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo. A 3-NT é formada pela nitração do aminoácido L-tirosina, ou de proteínas que contêm este aminoácido. A nitração pode ser feita por diversas espécies reativas como o peróxinitrito (ONO_2^-), o qual provém da reação do ânion superóxido (O_2^-) com o óxido nítrico (NO). Ambos podem ser provenientes da atividade de células fagocíticas (AHSAN, 2013). O 4-HNE é um aldeído formado pela peroxidação lipídica, o qual pode reagir facilmente com diversas moléculas de baixo peso molecular, assim como macromoléculas, tais como proteínas e DNA, envolvendo-se na patogênese de diferentes doenças (BARRERA et al., 2015). Selley (1998) demonstrou que existe um aumento na concentração de 4-HNE no LCR e no plasma de indivíduos com a DP. Além disso, Selley (1998) demonstrou que a administração de diferentes doses de 4-HNE, diretamente na SN de camundongos, leva a uma depleção de GSH, dependente da dose. Assim como o 4-HNE, o MDA também é um aldeído produzido pela peroxidação lipídica, principalmente de ácidos graxos poli-insaturados. Embora estudos demonstrem o aumento de MDA na SN de indivíduos com a DP, a relação dos níveis periféricos de MDA com o desenvolvimento da DP ainda é controversa; os resultados variam entre aumento, aumento sem correlação com o estágio da doença, ou ainda, nenhuma alteração (DIB et al., 2002; GOKCE COKAL et al., 2017).

Observou-se que a administração i.n. de NaDMDC levou a um aumento de 4-HNE no BO, o qual foi prevenido pela administração de melatonina. Além disso, o fator NaDMDC/Controle provocou um aumento no imunocontéudo de 3-NT e MDA nesta estrutura. Por outro lado, reforçando os dados obtidos no capítulo anterior, o estriado revelou ser mais susceptível à atividade pró-oxidativa do NaDMDC; os 3 parâmetros foram aumentados significativamente nos animais que receberam o ditiocarbamato. Além disso, a melatonina foi eficaz em prevenir o aumento no imunocontéudo de 3-NT e 4-HNE, reforçando a atividade antioxidante e neuroprotetora desta molécula.

Estudos prévios têm descrito o potencial antioxidante da melatonina (POEGGELER et al., 1994; MANCHESTER et al., 2015). Esta atividade pode ser produzida diretamente por seu mecanismo neutralizador de radicais livres, ou por vias mediadas pela ativação de receptores. Neste sentido, após a molécula de

melatonina neutralizar duas espécies reativas, ocorre a formação da 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHMc), a qual, assim como os metabólitos posteriores, AFMK e AMK, tem a capacidade de neutralizar radicais hidroxil, peróxidos de hidrogênio, oxigênio *singlet*, entre outros, de forma estequiométrica (HARDELAND; TAN; REITER, 2009; REITER et al., 2016). A capacidade da melatonina e três “gerações” de seus metabólitos de neutralizar espécies reativas é conhecida como cascata antioxidante da melatonina. Além disso, a ativação de receptores MT1 e MT2 pode estimular a atividade e a expressão de enzimas antioxidantes, como a glutatona peroxidase e a glutatona redutase, e aumentar a síntese de glutatona, atuando de maneira sinérgica para aumentar o potencial redutor das células (REITER et al., 2016).

O hipocampo e o córtex pré-frontal também apresentaram aumento de marcadores de estresse oxidativo devido à administração i.n. de NaDMDC. Entretanto nenhuma alteração significativa foi encontrada no cerebelo destes animais. Esta estrutura parece ser menos susceptível à toxicidade exercida pela administração i.n. de NaDMDC.

Para avaliação da participação da neuroinflamação na toxicidade inicial produzida pelo NaDMDC, avaliou-se os níveis de TNF- α . Como já discutido anteriormente, o TNF- α é um componente chave da resposta neuroinflamatória e está envolvido nos mecanismos neuropatológicos das doenças neurodegenerativas (OLMOS; LLADO, 2014). A administração i.n. de NaDMDC levou a um aumento significativo do TNF- α no estriado e no BO dos animais. Neste sentido, assim como ocorre com outras toxinas, como MPTP, 6-OHDA, rotenona e paraquat, a indução deste aumento inicial dos níveis de TNF- α pode estar relacionada com a produção de danos oxidativos às células e liberação de moléculas que iniciam o processo inflamatório, como padrões moleculares associados ao dano (DAMPs, do Inglês: *damage-associated molecular patterns*) (CEBRIAN; LOIKE; SULZER, 2015).

A administração de melatonina foi capaz de prevenir o aumento de TNF- α no BO, ação que pode estar relacionada com sua atividade antioxidante neuroprotetora. No entanto, diversos estudos demonstraram que a melatonina possui atividade anti-inflamatória através de mecanismos de inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, aumento da produção de citocinas anti-inflamatórias, inibição da expressão das enzimas óxido nítrico

sintase (ONS), ciclooxigenase (COX), além da inibição de fatores de transcrição como o fator nuclear κ -B (NF κ -B) (ESPOSITO; CUZZOCREA, 2010; MARKUS; CECON; PIRES-LAPA, 2013; MAURIZ et al., 2013). A administração de melatonina não alterou os níveis de TNF- α e não foi capaz de prevenir o aumento induzidos pelo NaDMDC no estriado. A diferença entre o efeito da melatonina no BO e no estriado pode estar relacionada com a maior susceptibilidade do estriado a toxicidade exercida pelo NaDMDC, como já indicado pelos nossos resultados descritos no capítulo anterior.

A avaliação do imunoconteúdo de TH no estriado, 24 h após a última administração i.n. de NaDMDC demonstrou um aumento nos animais que receberam o ditiocarbamato, corroborando os dados apresentados no capítulo anterior para o tempo de 7 dias. Como discutido anteriormente, este efeito pode ocorrer devido a tentativa de normalização da transmissão dopaminérgica alterada pelo NaDMDC. Entretanto, levando em consideração os dados obtidos de aumento do imunoconteúdo de 3-NT, podemos inferir a ocorrência da nitração da tirosina, precursora da dopamina, e da enzima TH, como possíveis mecanismos de interferência na transmissão dopaminérgica. A nitração e, por consequência, a inativação da TH, já demonstrou ter importância na toxicidade exercida pelo MPTP, como apresentado no estudo de Ara e colaboradores (1998), onde células PC12 expostas ao MPP⁺, assim como neurônios estriatais de camundongos que receberam MPTP, demonstraram um aumento da nitração seguido pela perda da atividade da TH. Ainda, o aumento das defesas antioxidantes pela superexpressão da enzima superóxido dismutase (SOD) levou a uma proteção contra a nitração da enzima TH.

Com relação aos receptores melatoninérgicos, realizamos a avaliação do imunoconteúdo de MT1 e MT2 no BO e estriado 24 h após a última administração i.n. de NaDMDC. A administração de NaDMDC levou ao aumento do imunoconteúdo de MT2 no BO. Os receptores melatoninérgicos são acoplados principalmente a proteínas G $\alpha_{i/o}$ e a redução dos níveis intracelulares de AMP cíclico é a via de sinalização mais comum desencadeada após sua ativação (CECON; OISHI; JOCKERS, 2017). A localização destes receptores no BO já foi demonstrada e pode estar relacionada a função olfatória, e os seus níveis nesta estrutura apresentam uma variação circadiana, demonstrando a importância da concentração de melatonina na sua regulação (CORTHELL; OLCESE;

TROMBLEY, 2014). Além disso, através da ativação de seus receptores, a melatonina pode atuar reduzindo o estresse celular, através da indução do aumento das defesas antioxidantes e de detoxificação, além de modular vias de sinalização intracelular, como ERK-MAPK, JNK/SAPK e Bcl2/Bax, resultando na inibição da apoptose (LUCHETTI et al., 2010).

A quantificação de neurotransmissores demonstrou que houve o aumento dos níveis de serotonina no BO provocado tanto pela administração de NaDMDC, quanto pela administração de melatonina. A serotonina é produzida através da conversão do triptofano a 5-hidroxitriptofano, pela enzima triptofano hidroxilase, então a enzima aminoácido descarboxilase realiza a síntese deste neurotransmissor, o qual pode ser convertido a melatonina através de enzimas já citadas anteriormente. O aumento de serotonina pela administração i.n. de NaDMDC corrobora nossos dados demonstrando um aumento da melatonina neste mesmo tempo. Neste sentido, Sun e colaboradores (SUN et al., 2002) demonstraram que existe um pico circadiano da produção de serotonina pela glândula pineal precedendo o pico de produção de melatonina, reforçando a relação entre a síntese das duas moléculas. Por outro lado, a regulação da produção de serotonina pela melatonina ainda não está bem descrita na literatura, portanto mais estudos são necessários para melhor compreensão do nosso resultado demonstrando que a administração i.p. de melatonina durante quatro dias consecutivos leva ao aumento dos níveis de serotonina no BO.

No estriado, a análise de variância demonstrou que houve uma redução de dopamina nos animais que receberam NaDMDC, embora o teste de múltiplas comparações não tenha apontado diferenças entre os grupos. Essa redução demonstrada vai de encontro com os dados apresentados neste estudo, onde fármacos que aumentam a transmissão dopaminérgica foram capazes de restaurar déficits motores induzidos pela administração do ditiocarbamato. Ainda, essa alteração nos níveis de dopamina pode ser responsável pela tentativa de normalização, através do aumento do imunoconteúdo de TH encontrado nesta estrutura.

Com o intuito de observar as alterações comportamentais e neuroquímicas a longo prazo, induzidas pela administração i.n. de NaDMDC, assim como verificar o possível efeito neuroprotetor da melatonina sobre essas alterações, realizamos as avaliações

comportamentais até o 35º dia após a última administração i.n. de NaDMDC e, posteriormente, do imunocorrelato de TH, DAT, MT1 e MT2.

A avaliação da atividade locomotora realizada no campo aberto no 4º dia após o fim do tratamento i.n. com NaDMDC confirmou os dados obtidos anteriormente em relação a toxicidade do NaDMDC e o efeito protetor da melatonina neste parâmetro. Entretanto, o teste do campo aberto realizado no dia 33 demonstrou que não houve diferença nos parâmetros distância percorrida e número de entradas no centro, os quais foram alterados no 4º dia, sugerindo uma possível reversão espontânea destes déficits.

A análise estatística não demonstrou diferença entre os grupos experimentais na avaliação do ENS, embora a magnitude do efeito entre o grupo NaDMDC e o grupo Controle tenha sido semelhante ao demonstrado em experimentos anteriores. Este fato pode ter ocorrido devido a diferença entre as análises estatísticas utilizadas, as quais foram alteradas para ajustar-se ao desenho experimental. Por outro lado, nossos resultados demonstraram que a administração i.n. de NaDMDC foi capaz de promover uma redução no tempo de latência para a queda no teste do rotarod, a qual foi estatisticamente significativa a partir do 14º dia, e assim permaneceu até o 34º dia após a última administração do ditiocarbamato. Estes prejuízos na função motora foram atenuados pela administração de melatonina. Embora nossos dados demonstraram que a administração de NaDMDC não provoca alterações iniciais em parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo no cerebelo, estrutura chave na realização desta tarefa, estudos demonstraram que a depleção dopaminérgica estriatal pode levar a déficits nesse parâmetro (SHIOTSUKI et al., 2010). O tempo de permanência do déficit indica o possível envolvimento de mecanismos não reversíveis, como a morte neuronal, na toxicidade do NaDMDC. Déficits de comportamentais de longo prazo, os quais foram prevenidos pela administração de melatonina já foram demonstrados com outras toxinas dopaminérgicas (MACK et al., 2016).

A avaliação do imunocorrelato de TH revelou que a administração i.n. de NaDMDC provocou uma redução significativa neste parâmetro 35 dias após o fim do tratamento. Esta redução pode estar relacionada com um dano oxidativo inicial nos neurônios da via nigroestriatal, como foi caracterizado pelos

nossos dados anteriores, apresentando aumento de EROs, dano a membrana celular e aumento de metabólitos advindos de danos oxidativos e nitrosativos nesta estrutura. Além disso, a administração de melatonina foi capaz de proteger contra esta alteração, reforçando seu papel neuroprotetor contra a toxicidade exercida pelo NaDMDC.

3.7 CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste capítulo reforçam a atividade neurotóxica do NaDMDC, provocando aumento em diversos parâmetros do estresse oxidativo/nitrosativo, além de interferir com os sistemas dopaminérgico e melatoninérgico, provocando déficits comportamentais duradouros. Além disso, demonstrou-se a capacidade da melatonina em proteger contra os danos provocados por este ditiocarbamato, destacando mais uma vez o grande potencial desta molécula em gerar proteção a neurônios submetidos a quadros de estresse agudo e crônico.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através de abordagens comportamentais, bioquímicas e neuroquímicas demonstramos, pela primeira vez, que a administração i.n. repetida de NaDMDC é capaz de provocar danos motores duradouros em camundongos. Esta toxicidade parece atingir neurônios dopaminérgicos da via nigro-estriatal, uma vez que o estriado mostrou-se mais susceptível aos danos oxidativos causados por esta molécula, e a administração de drogas dopaminérgicas revelou-se capaz de recuperar, mesmo que parcialmente, os danos provocados pelo ditiocarbamato. Tendo em vista a recente relação proposta para o envolvimento do DMDC com a etiopatologia da DP, estes dados são de grande importância por destacar o potencial tóxico desta molécula em mamíferos. Ainda, ressaltamos a importância da via olfatória no presente estudo, a qual demonstrou ser mais eficaz na produção dos efeitos tóxicos do NaDMDC, em comparação a via sistêmica, e tem como vantagem a capacidade de mimetizar uma via comum de contaminação ambiental a que os seres humanos estão expostos. Por outro lado, demonstramos que a administração i.n. de NaDMDC provoca um aumento dos níveis de melatonina e dos receptores MT2 no BO, e que este pode ser um possível mecanismo de defesa nesta estrutura contra produções agudas de espécies reativas, evitando, desta forma, maiores danos neuronais. O tratamento com melatonina exógena também demonstrou ser capaz de proteger os neurônios, não só do BO, como também do estriado e do córtex pré-frontal, dos danos oxidativos provocados pelo NaDMDC. Além disso, este neuro-hormônio foi capaz de evitar a neuroinflamação e alterações no sistema dopaminérgico estriatal. Desta forma, preveniu o surgimento de déficits comportamentais motores, demonstrando assim, o grande potencial neuroprotetor deste neuro-hormônio.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABSI, E. et al. . Protective effect of melatonin against the 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. **J Pineal Res**, v. 29, n. 1, p. 40-7, 2000.

ACUNA-CASTROVIEJO, D. et al. . Melatonin is protective against MPTP-induced striatal and hippocampal lesions. **Life Sci**, v. 60, n. 2, p. PI23-9, 1997.

ACUNA-CASTROVIEJO, D. et al. . Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. **Cell Mol Life Sci**, v. 71, n. 16, p. 2997-3025, 2014.

ADI, N. et al. Melatonin MT1 and MT2 receptor expression in Parkinson's disease. **Med Sci Monit**, v. 16, n. 2, p. Br61-7, 2010.

AGUIAR, A. S., JR. O exercício físico como agente modificador da doença de Parkinson e das discinesias induzidas por L-dopa - evidências obtidas em modelos experimentais. **TESE (DOUTORADO) - Universidade Federal de Santa Catarina, CCB. PPG FARMACOLOGIA**, 2011.

AGUIAR, L. M. et al. Melatonin reverses neurochemical alterations induced by 6-OHDA in rat striatum. **Life Sci**, v. 70, n. 9, p. 1041-51, 2002.

AHLSKOG, J. E.; MUENTER, M. D. Frequency of levodopa-related dyskinesias and motor fluctuations as estimated from the cumulative literature. **Mov Disord**, v. 16, n. 3, p. 448-58, 2001.

AHSAN, H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. **Hum Immunol**, v. 74, n. 10, p. 1392-9, 2013.

ALBUQUERQUE, A. F. et al. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ Sci Process Impacts**, v. 18, n. 7, p. 779-87, 2016.

ALLAIN, H.; BENTUE-FERRER, D.; AKWA, Y. Disease-modifying drugs and Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 84, n. 1, p. 25-39, 2008.

ALVIRA, D. et al. Inhibition of the cdk5/p25 fragment formation may explain the antiapoptotic effects of melatonin in an experimental model of Parkinson's disease. **J Pineal Res**, v. 40, n. 3, p. 251-8, 2006.

ANDERSEN, L. P. et al. The Safety of Melatonin in Humans. **Clin Drug Investig**, v. 36, n. 3, p. 169-75, 2016.

ANDREU, N. et al. L-Dopa-induced sedation: a double-blind cross-over controlled study versus triazolam and placebo in healthy volunteers. **Clin Neuropharmacol**, v. 22, n. 1, p. 15-23, 1999.

ANVISA. Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (para): relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2016.

ANVISA. Avaliação de agrotóxicos. In: **<http://www.portal.anvisa.gov.br/noticias/>**, 2017.

ARA, J. et al. Inactivation of tyrosine hydroxylase by nitration following exposure to peroxy nitrite and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 13, p. 7659-63, 1998.

ASCHERIO, A.; SCHWARZSCHILD, M. A. The epidemiology of Parkinson's disease: risk factors and prevention. **Lancet Neurol**, v. 15, n. 12, p. 1257-1272, 2016.

ASPELIN, A. L. Pesticide usage in the united states: trends during the 20th century **CENTER FOR INTEGRATED PEST MANAGEMENT NORTH CAROLINA STATE UNIVERSITY RALEIGH, NORTH CAROLINA, 2003.**

AXELROD, J.; WURTMAN, R. J.; SNYDER, S. H. Control of hydroxyindole o-methyltransferase activity in the rat pineal gland by environmental lighting. **J Biol Chem**, v. 240, p. 949-54, 1965.

AZEVEDO, L. A. S. Fungicidas protetores: fundamentos para uso racional. **Campinas: Emopi Edit. e Graf.**, 2003.

AZIZ, N. A. et al. Delayed onset of the diurnal melatonin rise in patients with Huntington's disease. **J Neurol**, v. 256, n. 12, p. 1961-5, 2009.

BAILEY, K. C., JN. Anxiety-Related Behaviors in Mice. **In: Buccafusco JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis. Chapter 5., 2009.**

BALTAZAR, M. T. et al. Pesticides exposure as etiological factors of Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases--a mechanistic approach. **Toxicol Lett**, v. 230, n. 2, p. 85-103, 2014.

BAO, J. F. et al. Melatonin attenuates 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced PC12 cell death. **Acta Pharmacol Sin**, v. 26, n. 1, p. 117-23, 2005.

BARBEAU, A. Manganese and extrapyramidal disorders (a critical review and tribute to Dr. George C. Cotzias). **Neurotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 13-35, 1984.

BARRERA, G. et al. Role of 4-hydroxynonenal-protein adducts in human diseases. **Antioxid Redox Signal**, v. 22, n. 18, p. 1681-702, 2015.

BARTELS, A. L. et al. Blood-brain barrier P-glycoprotein function decreases in specific brain regions with aging: a possible role in progressive neurodegeneration. **Neurobiol Aging**, v. 30, n. 11, p. 1818-24, 2009.

BASSANI, T. B. et al. Neuroprotective and antidepressant-like effects of melatonin in a rotenone-induced Parkinson's disease model in rats. **Brain Res**, v. 1593, p. 95-105, 2014.

BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 182-217, 2011.

BENI-ADANI, L. et al. A peptide derived from activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) ameliorates injury response in closed head injury in mice. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 296, n. 1, p. 57-63, 2001.

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

BEZARD, E. et al. Adaptive changes in the nigrostriatal pathway in response to increased 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurodegeneration in the mouse. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 8, p. 2892-900, 2000.

BLANCHARD, V. et al. Long-term induction of tyrosine hydroxylase expression: compensatory response to partial degeneration of the dopaminergic nigrostriatal system in the rat brain. **J Neurochem**, v. 64, n. 4, p. 1669-79, 1995.

BLANDINI, F. et al. Functional changes of the basal ganglia circuitry in Parkinson's disease. **Prog Neurobiol**, v. 62, n. 1, p. 63-88, 2000.

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

BLESA, J. et al. Oxidative stress and Parkinson's disease. **Front Neuroanat**, v. 9, 2015.

BOMBARDI, L. M. Intoxicação e morte por agrotóxicos no Brasil: a nova versão do capitalismo oligopolizado. **Boletim DATALUTA**, 2011.

BORDET, R. et al. Study of circadian melatonin secretion pattern at different stages of Parkinson's disease. **Clin Neuropharmacol**, v. 26, n. 2, p. 65-72, 2003.

BRAAK, H. et al. Amygdala pathology in Parkinson's disease. **Acta Neuropathol**, v. 88, n. 6, p. 493-500, 1994.

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

BRAAK, H. et al. Stages in the development of Parkinson's disease-related pathology. **Cell Tissue Res**, v. 318, n. 1, p. 121-34, 2004.

BROWN, T. P. et al. Pesticides and Parkinson's Disease—Is There a Link? **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 2, p. 156-64, 2006.

BRUNNER, P. et al. Pineal and cortical melatonin receptors MT1 and MT2 are decreased in Alzheimer's disease. **Eur J Histochem**, v. 50, n. 4, p. 311-6, 2006.

BRUNTON, L.; LAZO, J.; PARKER, K. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, Eleventh Edition**. McGraw-Hill Education, 2005. ISBN 9780071608916. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=PtWdBgnQdjMC>>.

BUBENIK, G. A. Thirty four years since the discovery of gastrointestinal melatonin. **J Physiol Pharmacol**, v. 59 Suppl 2, p. 33-51, 2008.

BURTON, S.; DAYA, S.; POTGIETER, B. Melatonin modulates apomorphine-induced rotational behaviour. **Experientia**, v. 47, n. 5, p. 466-9, 1991.

CARLSSON, A. Detection and assay of dopamine. **Pharmacol Rev**, v. 11, n. 2, Part 2, p. 300-4, 1959a.

CARLSSON, A. The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. **Pharmacol Rev**, v. 11, n. 2, Part 2, p. 490-3, 1959b.

CARRIERE, C. H.; KANG, N. H.; NILES, L. P. Chronic low-dose melatonin treatment maintains nigrostriatal integrity in an intrastriatal rotenone model of Parkinson's disease. **Brain Res**, v. 1633, p. 115-25, 2016.

CARRILLO-VICO, A. et al. Melatonin: buffering the immune system. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 4, p. 8638-83, 2013.

CASIDA, J. E. et al. Benomyl, aldehyde dehydrogenase, DOPAL, and the catecholaldehyde hypothesis for the pathogenesis of Parkinson's disease. **Chem Res Toxicol**, v. 27, n. 8, p. 1359-61, 2014.

CAZAMEA-CATALAN, D. et al. The timing of Timezyme diversification in vertebrates. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e112380, 2014.

CEBRIAN, C.; LOIKE, J. D.; SULZER, D. Neuroinflammation in Parkinson's disease animal models: a cell stress response or a step in neurodegeneration? **Curr Top Behav Neurosci**, v. 22, p. 237-70, 2015.

CECON, E. et al. Amyloid beta peptide directly impairs pineal gland melatonin synthesis and melatonin receptor signaling through the ERK pathway. **FASEB J**, v. 29, n. 6, p. 2566-82, 2015.

CECON, E.; OISHI, A.; JOCKERS, R. Melatonin receptors: molecular pharmacology and signalling in the context of system bias. **Br J Pharmacol**, 2017.

CHEN, L. J. et al. Melatonin protects against MPTP/MPP⁺-induced mitochondrial DNA oxidative damage in vivo and in vitro. **J Pineal Res**, v. 39, n. 1, p. 34-42, 2005.

CHEN, S. T. et al. Melatonin attenuates MPP⁺-induced neurodegeneration and glutathione impairment in the nigrostriatal dopaminergic pathway. **J Pineal Res**, v. 32, n. 4, p. 262-9, 2002.

CHETSAWANG, B.; GOVITRAPONG, P.; EBADI, M. The neuroprotective effect of melatonin against the induction of c-Jun phosphorylation by 6-hydroxydopamine on SK-N-SH cells. **Neurosci Lett**, v. 371, n. 2-3, p. 205-8, 2004.

CHETSAWANG, J.; GOVITRAPONG, P.; CHETSAWANG, B. Melatonin inhibits MPP⁺-induced caspase-mediated death pathway and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cultured cells. **J Pineal Res**, v. 43, n. 2, p. 115-20, 2007.

CHOI, S. I. et al. Melatonin protects against oxidative stress in granular corneal dystrophy type 2 corneal fibroblasts by mechanisms that involve membrane melatonin receptors. **J Pineal Res**, v. 51, n. 1, p. 94-103, 2011.

CHOU, A. P. et al. Ziram causes dopaminergic cell damage by inhibiting E1 ligase of the proteasome. **J Biol Chem**, v. 283, n. 50, p. 34696-703, 2008.

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

CONTI, A. et al. Evidence for melatonin synthesis in mouse and human bone marrow cells. **J Pineal Res**, v. 28, n. 4, p. 193-202, 2000.

CORTHELL, J. T.; OLCESE, J.; TROMBLEY, P. Q. Melatonin in the mammalian olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 261, p. 74-84, 2014.

COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. **J Neurosci**, v. 24, n. 48, p. 10993-8, 2004.

CREBELLI, R. et al. Further in vitro and in vivo mutagenicity assays with thiram and ziram fungicides: bacterial reversion assays and mouse micronucleus test. **Teratog Carcinog Mutagen**, v. 12, n. 3, p. 97-112, 1992.

CUNHA, C. D. What is the corticobasal circuitry for? In: **AGUIAR JR, A. S.; PEDIGER, R. D. S. Frontiers in Parkinson's Disease Research. Nova Biomedical**, 2012.

CUNHA, M. P. et al. MPP⁺-Lesioned Mice: an Experimental Model of Motor, Emotional, Memory/Learning, and Striatal Neurochemical Dysfunctions. **Molecular Neurobiology**, 2016.

DABBENI-SALA, F. et al. Melatonin protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in rats: a role for mitochondrial complex I activity. **Faseb j**, v. 15, n. 1, p. 164-170, 2001.

DAL-CIM, T. et al. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. **J Neurochem**, v. 126, n. 4, p. 437-50, 2013.

DE OLIVEIRA, P. A. et al. Moderate traumatic brain injury increases the vulnerability to neurotoxicity induced by systemic administration of 6-hydroxydopamine in mice. **Brain Res**, v. 1663, p. 78-86, 2017.

DE OLIVEIRA TATSCH-DIAS, M. et al. The concept of the immune-pineal axis tested in patients undergoing an abdominal hysterectomy. **Neuroimmunomodulation**, v. 20, n. 4, p. 205-12, 2013.

DENNIS, K. E.; VALENTINE, W. M. Ziram and sodium N,N-dimethyldithiocarbamate inhibit ubiquitin activation through intracellular metal transport and increased oxidative stress in HEK293 cells. **Chem Res Toxicol**, v. 28, n. 4, p. 682-90, 2015.

DHURIA, S. V.; HANSON, L. R.; FREY, W. H., 2ND. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. **J Pharm Sci**, v. 99, n. 4, p. 1654-73, 2010.

DI CHIARA, G. et al. Evidence for dopamine receptors mediating sedation in the mouse brain. **Nature**, v. 264, n. 5586, p. 564-567, 1976.

DI GIOVANNI, G.; PESSIA, M.; DI MAIO, R. Redox sensitivity of tyrosine hydroxylase activity and expression in dopaminergic dysfunction. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 11, n. 4, p. 419-29, 2012.

DI MONTE, D. A. The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? **Lancet Neurol**, v. 2, n. 9, p. 531-8, 2003.

DIAZ-CASADO, M. E. et al. Melatonin rescues zebrafish embryos from the parkinsonian phenotype restoring the Parkin/PINK1/DJ-1/MUL1 network. **J Pineal Res**, 2016.

DIB, M. et al. Can malondialdehyde be used as a biological marker of progression in neurodegenerative disease? **Journal of Neurology**, v. 249, n. 4, p. 367-374, 2002.

DOORN, J. A. et al. Aldehyde dehydrogenase inhibition generates a reactive dopamine metabolite autotoxic to dopamine neurons. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 20 Suppl 1, p. S73-5, 2014.

DOTY, R. L. The olfactory vector hypothesis of neurodegenerative disease: is it viable? **Ann Neurol**, v. 63, n. 1, p. 7-15, 2008.

DOTY, R. L. Environmental Influences on the Development of Parkinson's Disease. In: AGUIAR JR, A. S.; PREDIGER, R. D. S. **Frontiers in Parkinson's Disease Research.**, 2012.

DOTY, R. L. Olfactory dysfunction in Parkinson disease. **Nat Rev Neurol**, v. 8, n. 6, p. 329-39, 2012.

DOULL, J. The effect of physical environmental factors on drug response. **Essays in toxicology**, v. 3, 1972.

DRAGICEVIC, N. et al. Melatonin treatment restores mitochondrial function in Alzheimer's mice: a mitochondrial protective role of melatonin membrane receptor signaling. **J Pineal Res**, v. 51, n. 1, p. 75-86, 2011.

DUFOURNY, L. et al. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. **BMC Evol Biol**, v. 8, p. 105, 2008.

DUTY, S.; JENNER, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1357-91, 2011.

- EPA, U. Information on the Misuse of Sodium Dimethyldithiocarbamate. In: <http://www.epa.gov>, 2000.
- EPA. Pesticides Industry Sales and Usage: 2008-2012 Market Estimates. In: <http://www.epa.gov>, 2017a.
- EPA. United States Environmental Protection Agency. In: <http://www.epa.gov>, 2017b.
- ERREN, T. C.; REITER, R. J. Melatonin: a universal time messenger. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 36, n. 3, p. 187-92, 2015.
- ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. Antiinflammatory Activity of Melatonin in Central Nervous System. **Curr Neuropharmacol**, v. 8, n. 3, p. 228-42, 2010.
- FAREZ, M. F. et al. Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses. **Cell**, v. 162, n. 6, p. 1338-52, 2015.
- FERNANDES, P. A. et al. Local corticosterone infusion enhances nocturnal pineal melatonin production in vivo. **J Neuroendocrinol**, v. 21, n. 2, p. 90-7, 2009.
- FERTL, E. et al. Circadian secretion pattern of melatonin in Parkinson's disease. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 3, n. 1, p. 41-7, 1991.
- FERTL, E. et al. Circadian secretion pattern of melatonin in de novo parkinsonian patients: evidence for phase-shifting properties of l-dopa. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 5, n. 3, p. 227-34, 1993.
- FITZMAURICE, A. G. et al. Aldehyde dehydrogenase variation enhances effect of pesticides associated with Parkinson disease. **Neurology**, v. 82, n. 5, p. 419-26, 2014.

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

FRANKOLA, K. A. et al. Targeting TNF-alpha to elucidate and ameliorate neuroinflammation in neurodegenerative diseases. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 391-403, 2011.

FREIRE, C.; KOIFMAN, S. Pesticide exposure and Parkinson's disease: epidemiological evidence of association. **Neurotoxicology**, v. 33, n. 5, p. 947-71, 2012.

GANGEMI, S. et al. Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review). **Mol Med Rep**, v. 14, n. 5, p. 4475-4488, 2016.

GAO, J. et al. Daytime napping, nighttime sleeping, and Parkinson disease. **Am J Epidemiol**, v. 173, n. 9, p. 1032-8, 2011.

GELB, D. J.; OLIVER, E.; GILMAN, S. Diagnostic criteria for Parkinson disease. **Arch Neurol**, v. 56, n. 1, p. 33-9, 1999.

GOETZ, C. G. The History of Parkinson's Disease: Early Clinical Descriptions and Neurological Therapies. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 1, n. 1, 2011.

GOKCE COKAL, B. et al. Serum glutathione peroxidase, xanthine oxidase, and superoxide dismutase activities and malondialdehyde levels in patients with Parkinson's disease. **Neurol Sci**, v. 38, n. 3, p. 425-431, 2017.

GOLDSTEIN, D. S. et al. Determinants of buildup of the toxic dopamine metabolite DOPAL in Parkinson's disease. **J Neurochem**, v. 126, n. 5, p. 591-603, 2013.

GORDON, C. J. Toxic-induced hypothermia and hypometabolism: do they increase uncertainty in the extrapolation of toxicological data

from experimental animals to humans? **Neurosci Biobehav Rev**, v. 15, n. 1, p. 95-8, 1991.

GUTIERREZ-VALDEZ, A. L. et al. Effect of chronic L-dopa or melatonin treatments after dopamine deafferentation in rats: dyskinesia, motor performance, and cytological analysis. **ISRN Neurol**, v. 2012, p. 360379, 2012.

HAEHNER, A. et al. Prevalence of smell loss in Parkinson's disease--a multicenter study. **Parkinsonism Relat Disord**, v. 15, n. 7, p. 490-4, 2009.

HAIJEVA, P. et al. Novel imine antioxidants at low nanomolar concentrations protect dopaminergic cells from oxidative neurotoxicity. **J Neurochem**, v. 110, n. 1, p. 118-32, 2009.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology.**, v. 3, 1934.

HARDELAND, R.; TAN, D. X.; REITER, R. J. Kynuramines, metabolites of melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of biogenic amines. **J Pineal Res**, v. 47, n. 2, p. 109-26, 2009.

HAYEK, R., et al. The olfactory pathway as a possible route for aluminum entry to the brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 57, 1991.

HENRIKSSON, J.; TALLKVIST, J.; TJALVE, H. Transport of manganese via the olfactory pathway in rats: dosage dependency of the uptake and subcellular distribution of the metal in the olfactory epithelium and the brain. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 156, n. 2, p. 119-28, 1999.

HIGGINS, J. J.; TASHTOUSH, S. An aligned rank transform test for interaction. **Nonlinear World 1**. New York, 1994.

HIRSCH, E.; GRAYBIEL, A. M.; AGID, Y. A. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. **Nature**, v. 334, n. 6180, p. 345-8, 1988.

HIRSCH, E. C. et al. Iron and aluminum increase in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease: an X-ray microanalysis. **J Neurochem**, v. 56, n. 2, p. 446-51, 1991.

HOGLINGER, G. U. et al. A new dopaminergic nigro-olfactory projection. **Acta Neuropathol**, v. 130, n. 3, p. 333-48, 2015.

HORNYKIEWICZ, O. The discovery of dopamine deficiency in the parkinsonian brain. **J Neural Transm Suppl**, n. 70, p. 9-15, 2006.

HORNYKIEWICZ, O. A brief history of levodopa. **J Neurol**, v. 257, n. Suppl 2, p. S249-52, 2010.

HUANG, J. Y.; HONG, Y. T.; CHUANG, J. I. Fibroblast growth factor 9 prevents MPP+-induced death of dopaminergic neurons and is involved in melatonin neuroprotection in vivo and in vitro. **J Neurochem**, v. 109, n. 5, p. 1400-12, 2009.

IBAMA. Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental. In: <http://www.ibama.gov.br>, 2010.

IBGE. Censo Demográfico. **Rio de Janeiro: IBGE.**, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. In: <http://www.ibge.gov.br>, 2015.

INSIGHT. Produto Rotarod. In: <http://www.insightltda.com.br/>, 2017.

ISHIDO, M. Melatonin inhibits maneb-induced aggregation of alpha-synuclein in rat pheochromocytoma cells. **J Pineal Res**, v. 42, n. 2, p. 125-30, 2007.

ITANO, Y.; KITAMURA, Y.; NOMURA, Y. Biphasic effects of MPP⁺, a possible parkinsonism inducer, on dopamine content and tyrosine hydroxylase mRNA expression in PC12 cells. **Neurochem Int**, v. 26, n. 2, p. 165-71, 1995.

JABER, M. et al. Dopamine receptors and brain function. **Neuropharmacology**, v. 35, n. 11, p. 1503-19, 1996.

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

JANG, H. et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus can enter the central nervous system and induce neuroinflammation and neurodegeneration. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 106, n. 33, p. 14063-8, 2009.

JANKOVIC, J. Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v. 79, n. 4, p. 368-76, 2008.

JEONG, J. K.; PARK, S. Y. Melatonin regulates the autophagic flux via activation of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptors. **J Pineal Res**, v. 59, n. 1, p. 24-37, 2015.

JIANG, Y. et al. Intranasal delivery of stem cells to the brain. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 8, n. 5, p. 623-32, 2011.

JIN, B. K. et al. Melatonin protects nigral dopaminergic neurons from 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) neurotoxicity in rats. **Neurosci Lett**, v. 245, n. 2, p. 61-4, 1998.

JIN, J. et al. Involvement of the Sodium-Calcium exchanger 3 (NCX3) in ziram-induced calcium dysregulation and toxicity.

Neurotoxicology, v. 0, p. 56-66, 2014.

JINSMAA, Y. et al. Products of oxidative stress inhibit aldehyde oxidation and reduction pathways in dopamine catabolism yielding elevated levels of a reactive intermediate. **Chem Res Toxicol**, v. 22, n. 5, p. 835-41, 2009.

JOCKERS, R. et al. Update on melatonin receptors: IUPHAR Review 20. **Br J Pharmacol**, v. 173, n. 18, p. 2702-25, 2016.

JOO, W. S. et al. . Melatonin increases striatal dopaminergic function in 6-OHDA-lesioned rats. **Neuroreport**, v. 9, n. 18, p. 4123-6, 1998.

KAMAL, M. et al. Convergence of melatonin and serotonin (5-HT) signaling at MT2/5-HT2C receptor heteromers. **J Biol Chem**, v. 290, n. 18, p. 11537-46, 2015.

KAMEL, F. et al. Pesticide Exposure and Self-reported Parkinson's Disease in the Agricultural Health Study. **American Journal of Epidemiology**, v. 165, n. 4, p. 364-374, 2007.

KARNATOVSKAIA, L. V.; WARTENBERG, K. E.; FREEMAN, W. D. Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection: History, Mechanisms, Risks, and Clinical Applications. **Neurohospitalist**, v. 4, n. 3, p. 153-63, 2014.

KATZENSCHLAGER, R. et al. Fourteen-year final report of the randomized PDRG-UK trial comparing three initial treatments in PD. **Neurology**, v. 71, n. 7, p. 474-80, 2008.

KAWANO, T.; MARGOLIS, F. L. Transsynaptic regulation of olfactory bulb catecholamines in mice and rats. **J Neurochem**, v. 39, n. 2, p. 342-8, 1982.

KIM, G. H. et al. The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. **Exp Neurobiol**, v. 24, n. 4, p. 325-40, 2015.

KIM, Y. S. et al. Melatonin protects 6-OHDA-induced neuronal death of nigrostriatal dopaminergic system. **Neuroreport**, v. 9, n. 10, p. 2387-90, 1998.

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

KURLAND, L. T. Amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease complex on Guam linked to an environmental neurotoxin. **Trends Neurosci**, v. 11, n. 2, p. 51-4, 1988.

LAHIRI, D. K. Melatonin affects the metabolism of the beta-amyloid precursor protein in different cell types. **J Pineal Res**, v. 26, n. 3, p. 137-46, 1999.

LANGSTON, J. W. The MPTP Story. **J Parkinsons Dis**, v. 7, n. s1, p. S11-S22, 2017.

LANGSTON, J. W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. **Science**, v. 219, n. 4587, p. 979-80, 1983.

LANOIX, D. et al. Human placental trophoblasts synthesize melatonin and express its receptors. **J Pineal Res**, v. 45, n. 1, p. 50-60, 2008.

LEES, A. J.; HARDY, J.; REVESZ, T. Parkinson's disease. **Lancet**, v. 373, n. 9680, p. 2055-66, 2009.

LERNER, A. B. et al. Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 10, p. 2587-2587, 1958.

LEVOYE, A. et al. The orphan GPR50 receptor specifically inhibits MT1 melatonin receptor function through heterodimerization. **Embo j**, v. 25, n. 13, p. 3012-23, 2006.

LIU, T.; BORJIGIN, J. N-acetyltransferase is not the rate-limiting enzyme of melatonin synthesis at night. **J Pineal Res**, v. 39, n. 1, p. 91-6, 2005.

LIU, Y. J. et al. Cultured rat cortical astrocytes synthesize melatonin: absence of a diurnal rhythm. **J Pineal Res**, v. 43, n. 3, p. 232-8, 2007.

LIU, Z. et al. Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: From Molecular Mechanisms to Clinical Applications. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2017, p. 2525967, 2017.

LOCHHEAD, J. J.; THORNE, R. G. Intranasal delivery of biologics to the central nervous system. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 64, n. 7, p. 614-28, 2012.

LUCHETTI, F. et al. Melatonin signaling and cell protection function. **FASEB J**, v. 24, n. 10, p. 3603-24, 2010.

LULLA, A. et al. Neurotoxicity of the Parkinson Disease-Associated Pesticide Ziram Is Synuclein-Dependent in Zebrafish Embryos. **Environ Health Perspect**, v. 124, n. 11, p. 1766-1775, 2016.

MACK, J. M. et al. Melatonergic System in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Nonmotor Symptoms. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 3472032, 2016.

MACKAY, A. V. Assessment of anti-psychotic drugs. **Br J Clin Pharmacol**, v. 11, n. 3, p. 225-36, 1981.

MANCHESTER, L. C. et al. Melatonin: an ancient molecule that makes oxygen metabolically tolerable. **J Pineal Res**, v. 59, n. 4, p. 403-19, 2015.

MARKUS, R. P.; CECON, E.; PIRES-LAPA, M. A. Immune-pineal axis: nuclear factor kappaB (NF- κ B) mediates the shift in the melatonin source from pinealocytes to immune competent cells. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 6, p. 10979-97, 2013.

MARKUS, R. P. et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. **Neuroimmunomodulation**, v. 14, n. 3-4, p. 126-33, 2007.

MARTIN, V. et al. Involvement of autophagy in melatonin-induced cytotoxicity in glioma-initiating cells. **J Pineal Res**, v. 57, n. 3, p. 308-16, 2014.

MARTINS, E., JR. et al. Tryptophan consumption and indoleamines production by peritoneal cavity macrophages. **J Leukoc Biol**, v. 75, n. 6, p. 1116-21, 2004.

MATEI, A. M.; TROMBETTA, L. D. Exposure of rat hippocampal astrocytes to Ziram increases oxidative stress. **Toxicol Ind Health**, v. 32, n. 4, p. 579-88, 2016.

MATHEUS, F. C. et al. Neuroprotective effects of agmatine in mice infused with a single intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). **Behav Brain Res**, v. 235, n. 2, p. 263-72, 2012.

MAURIZ, J. L. et al. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. **J Pineal Res**, v. 54, n. 1, p. 1-14, 2013.

MAYEUX, R. Epidemiology of neurodegeneration. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 81-104, 2003.

MAYO, J. C. et al. Ultrastructural confirmation of neuronal protection by melatonin against the neurotoxin 6-hydroxydopamine cell damage. **Brain Res**, v. 818, n. 2, p. 221-7, 1999.

MAYO, J. C. et al. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for Parkinson's disease. **J Pineal Res**, v. 24, n. 3, p. 179-92, 1998.

MOLDZIO, R. et al. Rotenone damages striatal organotypic slice culture. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1148, p. 530-5, 2008.

MOLLER, M.; BAERES, F. M. The anatomy and innervation of the mammalian pineal gland. **Cell Tissue Res**, v. 309, n. 1, p. 139-50, 2002.

MORATO, G. S.; LEMOS, T.; TAKAHASHI, R. N. Acute exposure to maneb alters some behavioral functions in the mouse. **Neurotoxicol Teratol**, v. 11, n. 5, p. 421-5, 1989.

MOREIRA, E. L. et al. Central nervous system activity of the proanthocyanidin-rich fraction obtained from *Croton celtidifolius* in rats. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 8, p. 1061-8, 2010.

MORERA-FUMERO, A. L.; ABREU-GONZALEZ, P. Role of Melatonin in Schizophrenia. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 5, p. 9037-50, 2013.

MORETTI, M. et al. Effects of Agmatine on Depressive-Like Behavior Induced by Intracerebroventricular Administration of 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP(+)). **Neurotox Res**, v. 28, n. 3, p. 222-31, 2015.

MORETTO, A.; COLOSIO, C. Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: the example of Parkinson's disease. **Neurotoxicology**, v. 32, n. 4, p. 383-91, 2011.

- MORETTO, A.; COLOSIO, C. The role of pesticide exposure in the genesis of Parkinson's disease: epidemiological studies and experimental data. **Toxicology**, v. 307, p. 24-34, 2013.
- MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 268, n. 2, p. 157-77, 2013.
- MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. Pesticides: an update of human exposure and toxicity. **Arch Toxicol**, v. 91, n. 2, p. 549-599, 2017.
- MUROI, M.; TANAMOTO, K. Zinc- and oxidative property-dependent degradation of pro-caspase-1 and NLRP3 by ziram in mouse macrophages. **Toxicol Lett**, v. 235, n. 3, p. 199-205, 2015.
- MUSTAFA, G. et al. Brain targeting by intranasal drug delivery (INDD): a combined effect of trans-neural and para-neuronal pathway. **Drug Deliv**, v. 23, n. 3, p. 933-9, 2016.
- NASKAR, A. et al. Melatonin enhances L-DOPA therapeutic effects, helps to reduce its dose, and protects dopaminergic neurons in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced Parkinsonism in mice. **J Pineal Res**, v. 58, n. 3, p. 262-74, 2015.
- NILIUS, B.; FLOCKERZI, V. Mammalian transient receptor potential (TRP) cation channels. Preface. **Handb Exp Pharmacol**, v. 223, p. v - vi, 2014.
- NIRANJAN, R.; NATH, C.; SHUKLA, R. The mechanism of action of MPTP-induced neuroinflammation and its modulation by melatonin in rat astrocytoma cells, C6. **Free Radic Res**, v. 44, n. 11, p. 1304-16, 2010.
- O'NEAL-MOFFITT, G. et al. Prophylactic melatonin significantly reduces Alzheimer's neuropathology and associated cognitive

deficits independent of antioxidant pathways in AbetaPP(swe)/PS1 mice. **Mol Neurodegener**, v. 10, p. 27, 2015.

OLMOS, G.; LLADO, J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 861231, 2014.

OZSOY, O. et al. Melatonin is protective against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. **Free Radic Res**, v. 49, n. 8, p. 1004-14, 2015.

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

PARK, S. et al. Cloning and characterization of a serotonin N-acetyltransferase from a gymnosperm, loblolly pine (*Pinus taeda*). **J Pineal Res**, v. 57, n. 3, p. 348-55, 2014.

PATKI, G.; LAU, Y. S. Melatonin protects against neurobehavioral and mitochondrial deficits in a chronic mouse model of Parkinson's disease. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 99, n. 4, p. 704-11, 2011.

PIERMARTIRI, T. C. et al. Atorvastatin prevents hippocampal cell death, neuroinflammation and oxidative stress following amyloid-beta(1-40) administration in mice: evidence for dissociation between cognitive deficits and neuronal damage. **Exp Neurol**, v. 226, n. 2, p. 274-84, 2010.

PIMENTEL, D. Green revolution agriculture and chemical hazards. **Sci Total Environ**, v. 188 Suppl 1, p. S86-98, 1996.

PINATO, L. et al. Selective protection of the cerebellum against intracerebroventricular LPS is mediated by local melatonin synthesis. **Brain Struct Funct**, v. 220, n. 2, p. 827-40, 2015.

POEGGELER, B. et al. Melatonin--a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor: new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. **Ann N Y Acad Sci**, v. 738, p. 419-20, 1994.

POEWE, W. et al. Parkinson disease. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17013, 2017.

POLYORGANIC. POLY DDS NA 40. In:
<http://www.polyorganic.com.br>, 2017.

PONTES, G. N. et al. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. **J Pineal Res**, v. 43, n. 4, p. 365-71, 2007.

POSTUMA, R. B. et al. MDS clinical diagnostic criteria for Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 30, n. 12, p. 1591-601, 2015.

PREDIGER, R. D. et al. Intranasal administration of neurotoxicants in animals: support for the olfactory vector hypothesis of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 21, n. 1, p. 90-116, 2012a.

PREDIGER, R. D. et al. The intranasal administration of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP): a new rodent model to test palliative and neuroprotective agents for Parkinson's disease. **Curr Pharm Des**, v. 17, n. 5, p. 489-507, 2011.

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

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

PREDIGER, R. D. et al. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 3, p. 465-73, 2008.

PREDIGER, R. D. et al. Anxiety in Parkinson's disease: a critical review of experimental and clinical studies. **Neuropharmacology**, v. 62, n. 1, p. 115-24, 2012b.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

PRZEDBORSKI, S. The two-century journey of Parkinson disease research. **Nat Rev Neurosci**, v. 18, n. 4, p. 251-259, 2017.

PUTTONEN, K. A. et al. Different viabilities and toxicity types after 6-OHDA and Ara-C exposure evaluated by four assays in five cell lines. **Toxicol In Vitro**, v. 22, n. 1, p. 182-9, 2008.

RAVENHOLT, R. T.; FOEGE, W. H. 1918 influenza, encephalitis lethargica, parkinsonism. **Lancet**, v. 2, n. 8303, p. 860-4, 1982.

REITER, R. J. et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. **J Pineal Res**, v. 61, n. 3, p. 253-78, 2016.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; GALANO, A. Melatonin: exceeding expectations. **Physiology (Bethesda)**, v. 29, n. 5, p. 325-33, 2014.

RIBELAYGA, C.; PEVET, P.; SIMONNEAUX, V. HIOMT drives the photoperiodic changes in the amplitude of the melatonin peak of the Siberian hamster. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 278, n. 5, p. R1339-45, 2000.

RITZENTHALER, T. et al. Nocturnal urine melatonin and 6-sulphatoxymelatonin excretion at the acute stage of ischaemic stroke. **J Pineal Res**, v. 46, n. 3, p. 349-52, 2009.

RODRIGUES, M. A. T. Classificação De Fungicidas De Acordo Com O Mecanismo De Ação Proposto Pelo Frac. In: <https://repositorio.unesp.br/>, 2006.

ROJO, A. I. et al. Chronic inhalation of rotenone or paraquat does not induce Parkinson's disease symptoms in mice or rats. **Exp Neurol**, v. 208, n. 1, p. 120-6, 2007.

ROJO, A. I. et al. Persistent penetration of MPTP through the nasal route induces Parkinson's disease in mice. **Eur J Neurosci**, v. 24, n. 7, p. 1874-84, 2006.

SAKAGUCHI, K. et al. The rat oocyte synthesises melatonin. **Reprod Fertil Dev**, v. 25, n. 4, p. 674-82, 2013.

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

SARAVANAN, K. S.; SINDHU, K. M.; MOHANAKUMAR, K. P. Melatonin protects against rotenone-induced oxidative stress in a hemiparkinsonian rat model. **J Pineal Res**, v. 42, n. 3, p. 247-53, 2007.

SASAJIMA, H. et al. Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 106-15, 2015.

SAVASKAN, E. et al. Reduced hippocampal MT2 melatonin receptor expression in Alzheimer's disease. **J Pineal Res**, v. 38, n. 1, p. 10-6, 2005.

SCHAPIRA, A. H.; OLANOW, C. W. Neuroprotection in Parkinson disease: mysteries, myths, and misconceptions. **Jama**, v. 291, n. 3, p. 358-64, 2004.

SCHIPPERS, K. J.; NICHOLS, S. A. Deep, dark secrets of melatonin in animal evolution. **Cell**, v. 159, n. 1, p. 9-10, 2014.

SCHOMERUS, C.; KORF, H. W. Cholinergic signal transduction cascades in rat pinealocytes: functional and ontogenetic aspects. **Reprod Nutr Dev**, v. 39, n. 3, p. 305-14, 1999.

SCHWAB, R. S.; AMADOR, L. V.; LETTVIN, J. Y. Apomorphine in Parkinson's disease. **Trans Am Neurol Assoc**, v. 56, p. 251-3, 1951.

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

SELLEY, M. L. (E)-4-hydroxy-2-nonenal may be involved in the pathogenesis of Parkinson's disease. **Free Radic Biol Med**, v. 25, n. 2, p. 169-74, 1998.

SHARMA, R. et al. Physiological neuroprotection by melatonin in a 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. **Brain Res**, v. 1068, n. 1, p. 230-6, 2006.

SHIN, H. W.; CHUNG, S. J. Drug-Induced Parkinsonism. **J Clin Neurol**, v. 8, n. 1, p. 15-21, 2012.

SHIOTSUKI, H. et al. A rotarod test for evaluation of motor skill learning. **J Neurosci Methods**, v. 189, n. 2, p. 180-5, 2010.

SHOHAMI, E.; NOVIKOV, M.; BASS, R. Long-term effect of HU-211, a novel non-competitive NMDA antagonist, on motor and memory functions after closed head injury in the rat. **Brain Res**, v. 674, n. 1, p. 55-62, 1995.

SIMONNEAUX, V.; RIBELAYGA, C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 2, p. 325-95, 2003.

SINAN. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **iN**: <http://www.portalsinan.saude.gov.br/>, 2017.

SINGH, S. et al. Neuroprotection of the nigrostriatal dopaminergic neurons by melatonin in hemiparkinsonium rat. **Indian J Med Res**, v. 124, n. 4, p. 419-26, 2006.

SINGHAL, N. K. et al. Melatonin or silymarin reduces maneb- and paraquat-induced Parkinson's disease phenotype in the mouse. **J Pineal Res**, v. 50, n. 2, p. 97-109, 2011.

SINITOX. Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. **In**: <http://www.sinitox.ict.fiocruz.br/>, 2017.

SPILLANTINI, M. G. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies. **Nature**, v. 388, n. 6645, p. 839-40, 1997.

STEFULJ, J. et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. **J Pineal Res**, v. 30, n. 4, p. 243-7, 2001.

SU, L. Y. et al. Melatonin attenuates MPTP-induced neurotoxicity via preventing CDK5-mediated autophagy and SNCA/alpha-synuclein aggregation. **Autophagy**, v. 11, n. 10, p. 1745-59, 2015.

SUN, X. et al. Circadian 5-HT production regulated by adrenergic signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 7, p. 4686-91, 2002.

TALLKVIST, J. et al. Cadmium-metallothionein interactions in the olfactory pathways of rats and pikes. **Toxicol Sci**, v. 67, n. 1, p. 108-13, 2002.

TANNER, C. M. et al. Parkinson disease in twins: an etiologic study. **JAMA**, v. 281, n. 4, p. 341-6, 1999.

TAPIAS, V. et al. Melatonin and its brain metabolite N(1)-acetyl-5-methoxykynuramine prevent mitochondrial nitric oxide synthase induction in parkinsonian mice. **J Neurosci Res**, v. 87, n. 13, p. 3002-10, 2009.

TEIVE, H. A. G. O papel de Charcot na doença de Parkinson. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 56, p. 141-145, 1998.

TERRIFF, D. L. et al. Proteasomal proteolysis in the adrenergic induction of arylalkylamine-N-acetyltransferase in rat pinealocytes. **Endocrinology**, v. 146, n. 11, p. 4795-803, 2005.

TESSITORE, A. et al. Dopamine modulates the response of the human amygdala: a study in Parkinson's disease. **J Neurosci**, v. 22, n. 20, p. 9099-103, 2002.

THORNE, R. G. et al. Delivery of interferon-beta to the monkey nervous system following intranasal administration. **Neuroscience**, v. 152, n. 3, p. 785-97, 2008.

THORNE, R. G. et al. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. **Neuroscience**, v. 127, n. 2, p. 481-96, 2004.

TOMLIN, C. D. S. The pesticide manual: a world compendium. **Surrey, Uk: British Crop Protection Council, 12 ed.**, 2002.

TRINH, J.; FARRER, M. Advances in the genetics of Parkinson disease. **Nat Rev Neurol**, v. 9, n. 8, p. 445-54, 2013.

TRISTAO, F. S. et al. Evaluation of nigrostriatal neurodegeneration and neuroinflammation following repeated intranasal 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) administration in mice, an experimental model of Parkinson's disease. **Neurotox Res**, v. 25, n. 1, p. 24-32, 2014.

UCHIDA, K. et al. Daily rhythm of serum melatonin in patients with dementia of the degenerate type. **Brain Res**, v. 717, n. 1-2, p. 154-9, 1996.

VALKO, M.; MORRIS, H.; CRONIN, M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 10, p. 1161-208, 2005.

VAN DER MARK, M. et al. Is pesticide use related to Parkinson disease? Some clues to heterogeneity in study results. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 3, p. 340-7, 2012.

VIDENOVIC, A. et al. Circadian melatonin rhythm and excessive daytime sleepiness in Parkinson disease. **JAMA Neurol**, v. 71, n. 4, p. 463-9, 2014.

VILLELA, D. et al. Modulation of pineal melatonin synthesis by glutamate involves paracrine interactions between pinealocytes and astrocytes through NF-kappaB activation. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 618432, 2013.

WANG, A. et al. Parkinson's disease risk from ambient exposure to pesticides. **Eur J Epidemiol**, v. 26, n. 7, p. 547-55, 2011.

WANG, X. F. et al. Inhibitory effects of pesticides on proteasome activity: implication in Parkinson's disease. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 1, p. 198-205, 2006.

WEIHE, W. H. The effect of temperature on the action of drugs. **Annu Rev Pharmacol**, v. 13, p. 409-25, 1973.

WHO. Poisoning Prevention and Management. **iN:** <http://www.who.int>, 2012.

WOBBROCK, J.O. et al. The aligned rank transform for nonparametric factorial analyses using only ANOVA procedures. **Session: research methods**. Vancouver, 2011.

WU, Y. H. et al. Decreased MT1 melatonin receptor expression in the suprachiasmatic nucleus in aging and Alzheimer's disease. **Neurobiol Aging**, v. 28, n. 8, p. 1239-47, 2007.

WURTMAN, R. J.; AXELROD, J.; CHU, E. W. Melatonin, a pineal substance: effect on the rat ovary. **Science**, v. 141, n. 3577, p. 277-8, 1963.

YERAGANI, V. K. et al. Arvid Carlsson, and the story of dopamine. **Indian J Psychiatry**, v. 52, n. 1, p. 87-8, 2010.

YILDIRIM, F. B. et al. Mechanism of the beneficial effect of melatonin in experimental Parkinson's disease. **Neurochem Int**, v. 79, p. 1-11, 2014.

YU, H. et al. GABAergic signaling in the rat pineal gland. **J Pineal Res**, 2016.

YUREK, D. M. et al. Morphological, neurochemical, and behavioral characterizations associated with the combined treatment of diethyldithiocarbamate and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in mice. **Brain Res**, v. 497, n. 2, p. 250-9, 1989.

ZAITONE, S. A.; HAMMAD, L. N.; FARAG, N. E. Antioxidant potential of melatonin enhances the response to L-dopa in 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine-parkinsonian mice. **Pharmacol Rep**, v. 65, n. 5, p. 1213-26, 2013.

ZHOU, J. N. et al. . Early neuropathological Alzheimer's changes in aged individuals are accompanied by decreased cerebrospinal fluid melatonin levels. **J Pineal Res**, v. 35, n. 2, p. 125-30, 2003.

ZIGMOND, M. J. et al. Neurochemical compensation after nigrostriatal bundle injury in an animal model of preclinical parkinsonism. **Arch Neurol**, v. 41, n. 8, p. 856-61, 1984.

ZIGMOND, M. J.; STRICKER, E. M. Animal models of parkinsonism using selective neurotoxins: clinical and basic implications. **Int Rev Neurobiol**, v. 31, p. 1-79, 1989.